

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL
DE LA RNP RECOMBINANTE
DEL VIRUS DE LA GRIPE**

TESIS DOCTORAL

ROCÍO COLOMA CIUDAD
Octubre, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL
DE LA RNP RECOMBINANTE
DEL VIRUS DE LA GRIPE**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por
Rocío Coloma Ciudad
para optar al título de Doctor
Madrid, Octubre 2009

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de los Dres. Juan Ortín Montón y Jaime Martín-Benito Romero.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Pues como dice todo el mundo, efectivamente, esta es la parte mas difícil de escribir. Y no porque resulte complicado dar las gracias, sino porque lo complicado es no olvidarse de todas esas personas que han pasado por mi vida en este tiempo, y que de alguna manera entre todos habéis hecho posible esta Tesis.

Empezaré por orden y si me dejo a alguien por el camino, espero que me perdone y que aunque no esté aquí reflejado le agradezco enormemente el haberse cruzado en mi camino.

Por supuesto, el jefe, Juan. ¿Qué hubiera sido de mi si me hubiera perdido todo esto? Y es que yo ya lo sabía desde aquel día en que un grupito de estudiantes vinimos a entrevistarnos con Juan. “Este es mi sitio”, lo tenía clarísimo. Y más tarde cuando me marché, dejé algunas chinitas en el camino para poder volver. Y es que Alex decidió dejar la ciencia, asíque parece que los astros se alinearon para que yo volviera a este extraño mundo del virus de la gripe. A pesar de mi carácter, porque Juan ya me había calado, me ofreció aquel proyecto de estructura, que por aquel entonces me sonaba a chino (¿os lo podéis creer?). ¡Ay, Juan!, menos mal que me quedo aún un poco más, porque ¿con quién ibas a discutir sino? Esas charlas en el despacho, que más que un despacho jes el Gran Bazar con tanto regateo!. Mil gracias por darme la oportunidad de participar en esta aventura que es la ciencia, gracias por animarme a intentarlo “una” vez mas, y sobre todo gracias por creer en mi.

Y el otro jefe, Jaime, que aunque a veces se nos olvide, ¡tu también eres jefe!. Me acuerdo perfectamente de tu cara el día en que Estela me presentó como tu nueva estudiante. Pero después de todo no ha salido tan mal, ¿no?. Yo me lo he pasado genial, en el micro tratando de ver algo, que para mi te lo inventabas, o cuando intentabas explicarme no se qué fenómenos físicos con un dibujo de Einstein, que para mi son inexplicables, o el procesamiento de las imágenes en el ordenador. ¡No te preocupes Jaime, que la idea básica se me ha quedado!. Tienes que entenderlo, ¡soy bióloga!. En cualquier caso mil gracias por enseñarme todas esas cosas que se pueden hacer con el ordenador, gracias por darle otra oportunidad a la RNP, gracias por la mitad de esta Tesis, que es obra tuya sin lugar a dudas, y por creer que es un gran trabajo.

Y la jefa, Amelia. Y es que en todos los laboratorios debería de haber 2 jefes. Otro punto de vista, otra visión, que nos “desengorile” cuando estamos en el lío. Más ideas para experimentar y discutir, más propuestas para investigar. Y además de la ciencia, es genial tenerte para cambiar de tema cuando los chicos imponen su monólogo. Gracias por estar ahí, cerca de nosotros.

Y ahora me remonto al principio de los tiempos, al principio de cuando llegué al 116. Mi primer aliado fue Ana Falcón, el ojito derecho de Juan, que me enseñó a pasar células con muchísimo cuidado. ¡Qué complicado parecía aquello visto por primera vez!. Gracias por tu paciencia y por tu tiempo. Después Pablo fue el que me enseñó a trabajar en el laboratorio. Me enseñó todos los truquitos para purificar proteínas, hacer geles y revelarlos por WB. Así que, en parte esta Tesis es tuya, porque de no haberme enseñado esas cosas, esos geles tan bonitos nunca me hubieran salido. Gracias por la ciencia, la práctica, y la paciencia. Que con lo tranquilo que estabas llegué yo a ocupar tu espacio y revolucionarte. Y aunque la mega-polimerasa nunca fue portada de Nature, ¡no me ha ido mal!. ¿Y Patri Villacé? ¡Qué torbellino!, ¿qué hubiera hecho yo sin ti en la poyata de al lado? Las canciones, las noticias mas insospechadas, el no parar. ¡Cuánto te hemos echado de menos en el 116! Gracias por enseñarme el mundo ¡¡¡RNAsa freeeee!!!. Por aquel tiempo estaba Estela, que yo no me imaginaba que seguiría tu trabajo, y aquí me ves. Gracias por enseñarme en tiempo record todo sobre el micro, y el ordenador. ¡Juntas hemos desvelado todos los misterios de las RNPs!. Y Alex, con quien no coincidí por que decidió recorrer otros senderos, pero le agradezco que me dejara su beca y su proyecto. Eva, que también entiende de esto, gracias por enseñarme que no hay que fiarse, por tu alegría y tu energía, ¡y por esos apuntes indescriptibles!. A Yolanda, ¡no se por donde empezar! Gracias, gracias, gracias, por todo lo que haces por nosotros, por tener siempre una sonrisa, por estar siempre dispuesta,

por tu cordura, por tantas y tantas cosas, que esta Tesis nunca hubiera sido posible sin ti. A Ali, en tu Tesis decías algo así como “tan iguales y tan distintas”, ¡yo nunca lo hubiera dicho mejor!. Gracias por estar ahí siempre, por ser mi amiga, y por todos esos ratos que hacen que esto sea el mejor trabajo del mundo. En aquellos tiempos aparecieron Iñigo, con quien compartí ratos de biblioteca, y Sandra, que me cedió un huequito en su poyata durante mi “avanzada”. Y en el 118, el labo gemelo de gripe del CNB, estaban Maite e Idoia que completaban el grupo de gripe al que todo el mundo se quería venir. Y cuando me marché llagaban Urtzi y el argentino, Ariel. ¡Menudas 2 adquisiciones!. Gran parte del saber de gripe y del labo está en esas 2 cabezas privilegiadas, y las preguntas y respuestas. Gracias a los 2 por toda esa sabiduría que transmitís. A Urtzi, por su rigurosidad, bien heredada de Ana, por mil y un protocolos, por “apaciguar” aquel labo de chicas alborotadas. A Ariel, gracias por esos pCMVs, y sobre todo por el pHHCAT, con el que hemos hecho maravillas.

A mi regreso a 116, las cosas eran distintas, pero seguía lleno de gente maravillosa. Había llegado Núria, la primera de una larga lista de catalanes. Juan, ¿en qué momento cambiaste a los vascos por los catalanes?. Y tuve la suerte de compartir la poyata con ella, y de trabajar juntas en un proyecto que ha resultado ¡todo un descubrimiento!. Gracias por estar siempre disponible, por dejarme tus búferes, plásmidos, etc., etc. Por compartir venturas y desventuras del virus este, ¡y mil anécdotas!. Aún no he vuelto al labo y no he notado que te has ido, pero en cuanto vuelva..te echaré de menos. Al poquito llegó Emilio, la alegría y el entretenimiento del labo. Sin ti esto no sería igual, gracias por convertir cada momento en una risa, y por tu atención, ¡y es que no se puede estar en un labo de chicas y no darte cuenta de que me he cortado el pelo!. Gracias por hacer de los congresos el mejor de los viajes y hacer de los seminarios el club de la comedia. También estaba Tom, que aunque solía pasar desapercibido, tenía unos dejes argentinos capaces de descolocarte por completo. Y después llegaron Susana y al poquito Merche. Susan la otra compi de esos ratos que hacen que esto sea el mejor trabajo. Una maravilla del labo que aunque a veces se desespera, es muy fácil cogerle el tempo. Y me encanta tenerte cerca, porque resuelves dudas, me consuelas y me escuchas. Merche, mi compi de “penurias” que se nos marchó a canarias, a pesar de ser andaluza hasta los huesos. Gracias por aquellos momentos en que nos “llorábamos” la una a la otra con nuestros experimentos y por ser siempre tan cariñosa. También llegó Roberto, el chico callado de Soria, que aunque es muy tímido, luego nos sorprende con sus seminarios, y ¡con aquellas setas!. Después llegó la siguiente catalana, la Patri (Resa-Infante), y volvió al labo el espíritu de las cervecitas y las quedadas. Y aunque es más pequeña y ha llegado después, ¡madre mía lo que sabe!, ¡y cómo maneja!. Gracias Patri por compartir tu sabiduría, tus truquitos, por tu paciencia, por poner a punto el maldito cacharro ese, por tu alegría y efusividad, por compartir este duro mundo de la estructura, ¡porque me entiendes cuando hablo!. Y también llegó Noe, la fuerza y la optimización del labo, porque uno no puede dormirse en los laureles, ¡hay que ver que eficacia!. Y es que cualquier experimento al lado del tándem Patri-Noe, dura una eternidad, y seguro que no sale tan bien. Gracias por todo lo que nos aguantas, por tu ayuda, tu disposición, por esa sonrisa con la que enfrentas el día y los retos, porque se contagia y haces que el labo sea un mundo mejor. Y el torbellino intelectual de Maite, que para cuando tu has ido, ella ha ido y ha vuelto 2 veces. No podía ser de otra manera, NS1, ¿Lo dará el proyecto o es que ese proyecto así lo requiere? ¡Qué cabeza! Gracias por hacer “la” pregunta y plantearnos el dilema, por ese punto distinto de todos los demás. Las estudiantes Asun, Carmen, Vero, Esther y Claudia (la alemana), que compartieron risas y un poco del virus de la gripe. Después llegaron los peques, Sara y Joan, los últimos estudiantes de Juan, (o eso dice). Charinii, la defensora del pueblo, protege a los más débiles y apacigua las aguas cuando los caracteres se enfrentan. Gracias por estar ahí, por poner paz, por tu sonrisa y amabilidad, por ser tan cariñosa, y por venir pisando fuerte, así los más antiguos no nos dormimos en los laureles. Y Joan, la última adquisición catalana del labo, el único chico. Y es que en el 116 siempre ha predominado el sexo femenino, ¡las chicas al poder!. Por suerte, Juan siempre tiene un as, o sea un chico, que cambia las hormonas y regula el temperamento. Gracias, por tu paciencia, por tu tranquilidad, por la ironía con que te tomas nuestras excentricidades, por añadir una nota de color al labo. Y por último llegaron al labo Lore y Marcela, ¡una argentina y una chilena juntas, poyata con poyata!, y Paloma. Ellas completan este círculo de gente fantástica con quien he compartido estos 5 años y medio de Tesis, más uno de estudiante. Gracias a todos por vuestros consejos, vuestro

apoyo y ayuda en este tiempo.

No puedo olvidarme de mis compañeros del otro labo, ¡los de abajo!. José Mari Valpuesta, que aunque ahora es el dire, ha picado mil y una RNP e hizo posible la CRIO, ¿qué hubiera hecho yo sin ti?. Desde luego esta Tesis no. Mil gracias por tu trabajo, por tu tiempo (que es realmente difícil de conseguir) y por esos “chistes” en mitad de cualquier frase. Pepe Carrascosa, gracias por las aportaciones en los momentos de decisión. Rocío pequeña (para distinguir), siempre dispuesta a echarme una mano en ese mundillo. Gracias por hacerme sentir cómoda, por explicarme como funciona vuestro mundo, por las rejillas y por todo lo que haces para que la vida de los estructurólogos y microscopistas sea más sencilla. Xabi, que compartió conmigo aquellos primeros momentos enfrente de un ordenador. Gracias por ayudarme a encontrarme en las dichosas pantallas, por poner una nota divertida a los blancos y negros, por esa fantástica Tesis que me da tanta envidia. Iñaki, que me enseñó la bioquímica moderna e intentó que purificar RNPs fuera más fácil y rápido. Gracias por tus consejos y por tu apoyo. Y Mari Carmen, que me ayudó a llevar a cabo esas ideas, gracias por tus manos expertas y por tu ayuda. Jorge, gracias por prestarme ese precioso tesoro, la CCT purificada, que me sirvió de control para las RNPs. Y Javi, gracias por tu infinita amabilidad, por tu tiempo, por tu paciencia y por esas preciosas micrografías y tomogramas de viriones purificados (espero impaciente las reconstrucciones). Sin vuestra ayuda las RNPs no serían como son, gracias por ayudarme a terminar esta Tesis.

Por supuesto no puedo olvidarme de Socorro, porque nos hace la vida mucho más fácil, porque su sonrisa matutina y sus ganas se contagian, y así empezar a trabajar un Lunes o después de las vacaciones no cuesta tanto. Y como dice ella “tenemos trabajo”. Gracias Socorro, porque sin ti el CNB no sería igual.

Tampoco puedo olvidarme de agradecer a los que me conocen desde hace tanto que ni me acuerdo.

A mis amigas de toda la vida, Nekane, Mónica y Marta. Gracias por vuestro apoyo incondicional durante todos estos años, por creer que lo que hago es importante, por escucharme, tratar de entenderme, y aconsejarme. Gracias por estar siempre ahí, a un toque de teléfono o un mail del auxilio. A Nekane en particular, te dedico parte de mi Tesis por sentirte orgullosa de mi y de la ciencia, porque aunque dejaste los cacharritos por la Calidad, en el fondo eres una Bioquímica de tomo y lomo.

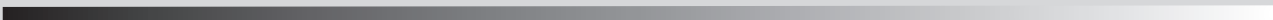
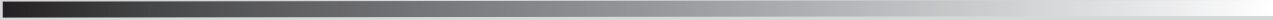
A mi prima Marta G. que comparte conmigo las experiencias de la ciencia, y siempre me viene bien para darme un paseíto por el CNB.

A mis padres, a quienes dedico esta Tesis. Porque se lo debo todo. Porque nunca se lo digo y debería pasarme el tiempo agradeciéndoles todo lo que hacen por mi. Porque me apoyan y me animan, porque siempre hay un lado positivo, y porque gracias a ellos la vida es maravillosa. Por creer que lo que hago es importante, por alegrarse por mis triunfos, y por tantas y tantas cosas...Gracias por estar siempre ahí.

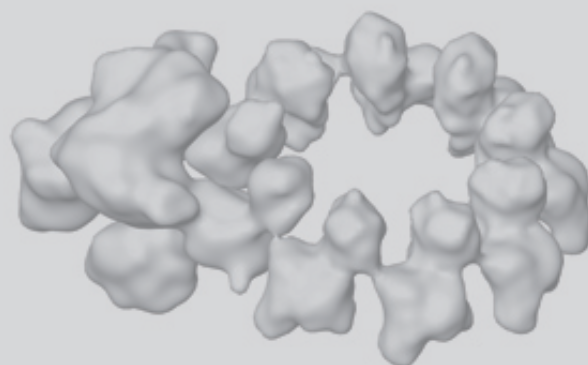
A mis hermanos, que aunque no tienen ni idea de lo que hago, creen que es importante. Y por que la vida con ellos es más divertida, sin lugar a dudas.

Y a Isra. Gracias por “sufrirme” cada día, por estar siempre al pie del cañón, por quererme como soy. Por ser mi salvavidas cuando me ahogo en un vaso de agua, y por celebrar mis alegrías. Por tratar de entender alguna palabra cuando te hablo del labo. A ti también te dedico esta Tesis, por acompañarme en esta aventura de la ciencia y en la vida.

Gracias a todos por hacer posible esta Tesis.



ÍNDICE



SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	23
EL VIRUS DE LA GRIPE	25
1. HISTORIA	
2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA	
3. LA PARTÍCULA VIRAL	
- PROTEÍNAS VIRALES	
4. RNAs VIRALES	
LA RIBONUCLEOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA GRIPE	29
1. LA POLIMERASA VIRAL	
- PB1	
- PB2	
- PA	
2. LA NUCLEOPROTEÍNA	
CICLO DE INFECCIÓN VIRAL	35
1. ENTRADA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES	
2. TRANSCRIPCIÓN, REPLICACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA	
3. PROCESAMIENTO DE LOS RNAs VIRALES Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	
4. FORMACIÓN Y SALIDA DE NUEVAS PARTÍCULAS VIRALES	
PROCESOS DE REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE	38
1. TRANSCRIPCIÓN VIRAL	
2. REPLICACIÓN VIRAL	
FACTORES CELULARES ASOCIADOS A LAS RNPs	40
ESTUDIO ESTRUCTURAL DE MAQUINARIAS DE REPLICACIÓN	41
1. ABORDAJES TRIDIMENSIONALES	
2. REQUERIMIENTOS	
3. DE LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO A LA OBTENCIÓN DE UN MODELO 3D	
- EL PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN	
- ANÁLISIS BIDIMENSIONAL	
- RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES	
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
MATERIALES	53
1. LÍNEAS CELULARES	
2. BACTERIAS	
3. VIRUS	
4. PLÁSMIDOS	
5. ANTICUERPOS	
6. RESINAS DE CROMATOGRAFÍA	

MANIPULACIÓN DEL DNA Y CLONAJES

- 1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PCMV PB2-HIS**
- 2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PHH CLON 23**
- 3. MUTANTES DE NP**

GENERACIÓN Y TITULACIÓN DE VTF7-3

- 1. GENERACIÓN DE STOCKS DE VIRUS**
- 2. TITULACIÓN MEDIANTE ENSAYO EN PLACA**

MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

- 1. RECONSTITUCIÓN DE RNPS IN VIVO**
 - 1.1 PARA ANÁLISIS ESTRUCTURAL**
 - 1.2 PARA ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN**
- 2. RECONSTITUCIÓN DE POLIMERASA IN VIVO**
- 3. EXPRESIÓN DE NUCLEOPROTEÍNA**
- 4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES**

PURIFICACIÓN DE RNPS

PASO1. PURIFICACIÓN DE RNPS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

PASO 2. PURIFICACIÓN DE RNPS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

PASO 3. CONCENTRACIÓN DE RNPS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

- 1. WESTERN BLOT**
- 2. TINCIÓN DE GELES Y MEMBRANAS**
- 3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CAT**
- 4. PURIFICACIÓN DE OLIGÓMEROS DE NUCLEOPROTEÍNA POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR**

MANIPULACIÓN DEL RNA

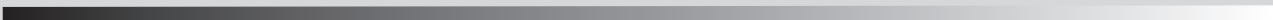
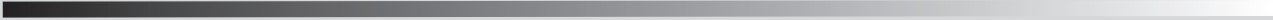
- 1. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DE LAS RNPS**
- 2. DIGESTIÓN CONTROLADA DEL RNA**
- 3. MARCAJE DEL RNA**

MICROSCOPIA

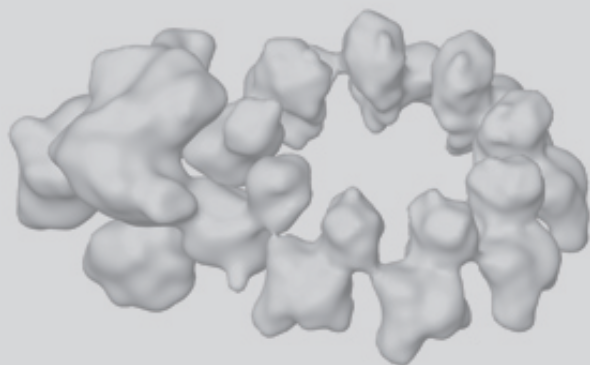
- 1. TINCIÓN NEGATIVA**
- 2. CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA**
- 3. DIGITALIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES**
- 4. DOCKING**

RESULTADOS**63****DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA RNP RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA GRIPE****65****1. GENERACIÓN DE RNPS RECOMBINANTES****1.1 RECONSTITUCIÓN DE RNPS****1.1.1 LÍNEAS CELULARES, PLÁSMIDOS Y REACTIVOS DE TRANSFECCIÓN**

1.1.2 RECONSTITUCIÓN ESTÁNDAR	
1.2 PURIFICACIÓN DE RNPS	
1.2.1 SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS Y TAMPONES DE PURIFICACIÓN	
1.2.2 PURIFICACIÓN ESTÁNDAR	
2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RNP RECOMBINANTE	
2.1 MODELO DE LA RNP POR ME DE MUESTRAS TEÑIDAS	
2.2 ESTRUCTURA DE LA RNP POR CRIOMICROSCOPÍA ELECTRÓNICA	
2.3 LOCALIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES EN LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE LA POLIMERASA	
2.4 DOCKING DE LA ESTRUCTURA ATÓMICA DE LA NP EN EL ANILLO DE NP	
2.5 ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DEL RNA EN LA RNP DEL VIRUS DE LA GRIPE	
ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RNP DEL VIRUS DE LA GRIPE	76
1. MUTANTES DE NP EN LA ZONA DE INTERACCIÓN NP-NP	
2. MUTANTES DE NP EN LA ZONA DE INTERACCIÓN NP-POLIMERASA	
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN	81
1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN	
2. ANÁLISIS GENÉTICO DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN	
DISCUSIÓN	89
1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RNP	91
1.1 LA ESTRUCTURA DE LA RNP	
1.2 EL ANILLO DE NP	
1.3 LA POSICIÓN DEL RNA	
1.4 ESTRUCTURA DE LA POLIMERASA Y LOCALIZACIÓN DE LOS DOMINIOS DE LAS SUBUNIDADES	
1.5 RESUMEN FINAL DE LA ESTRUCTURA DE LA RNP	
2. NUEVO MODELO DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL	97
2.1 ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN	
2.2 ¿PUEDE UNA RNP SILVESTRE COMPLEMENTAR A OTRA RNP DEFECTIVA EN TRANSCRIPCIÓN?	
2.3 ¿PUEDE UNA POLIMERASA SOLUBLE INCREMENTAR LA TRANSCRIPCIÓN DE UNA RNP?	
2.4 NUEVO MODELO DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL	
2.5 EL NUEVO MODELO DE TRANSCRIPCIÓN EN CIS EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN VIRAL	
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXO	131

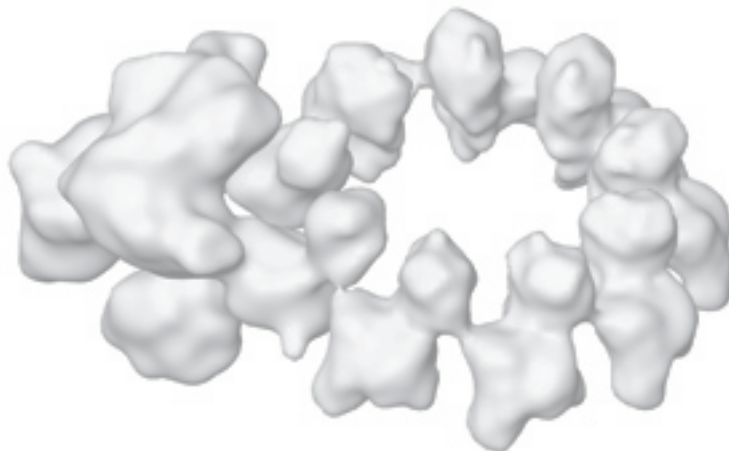


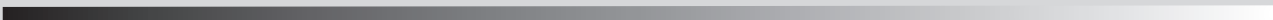
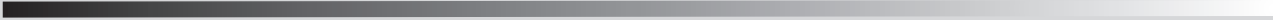
SUMMARY



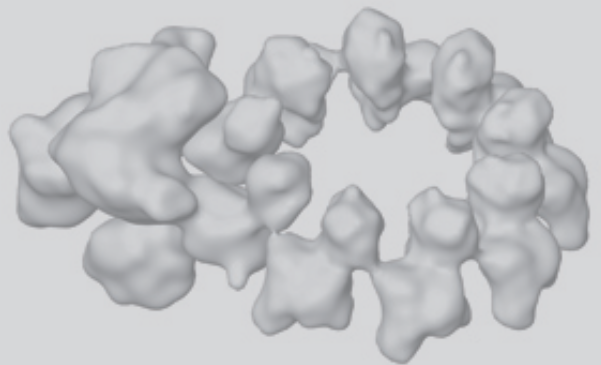
The influenza viruses contain a segmented, single-stranded RNA genome of negative polarity. Each RNA segment is encapsidated by the nucleoprotein and the polymerase complex into ribonucleoprotein particles (RNPs), which are responsible for virus transcription and replication. Despite their importance, information about the structure of these RNPs is scarce. In this Doctoral Thesis the three-dimensional structure of a biologically active recombinant RNP by cryo-electron microscopy is described. The structure shows a nonameric nucleoprotein ring (at 12 Å resolution) with two monomers connected to the polymerase complex (at 18 Å resolution). Docking the atomic structures of the nucleoprotein and polymerase domains, as well as mutational analyses, has allowed us to define the interactions between the functional elements of the RNP and to propose the location of the viral RNA. Our results provide the first model for a functional negative-stranded RNA virus ribonucleoprotein complex. The structure reported here will serve as a framework to generate a quasi-atomic model of the molecular machine responsible for viral RNA synthesis and to test new models for virus RNA replication and transcription

Viral RNA replication proceeds by formation of a complementary RNP of positive polarity (cRNP) that serves as intermediate to generate many progeny vRNPs. Transcription initiation takes place by a cap-snatching mechanism whereby the polymerase steals a cellular capped oligonucleotide and uses it as primer to copy the vRNP template. Transcription termination occurs prematurely at the polyadenylation signal, which the polymerase copies repeatedly to generate a 3' terminal polyA. Here we studied the mechanisms of the viral RNA transcription. We used efficient systems for recombinant RNP transcription/replication *in vivo* and well-defined polymerase mutants deficient in RNA transcription to address the roles of the polymerase complex present in the template RNP and newly synthesised polymerase complexes during transcription. The results of trans-complementation experiments showed that only transcription *in cis* could be detected. These results are compatible with a new model for virus RNA transcription where the resident polymerase complex would be responsible for mRNA synthesis and polyadenylation.





INTRODUCCIÓN



EL VIRUS DE LA GRIPE

1. HISTORIA

El virus de la gripe es un agente patógeno altamente variable que ocasiona infecciones respiratorias en humanos en forma de epidemias anuales y pandemias ocasionales. En su origen, estos virus están en equilibrio evolutivo en algunas especies, especialmente en aves silvestres, en las que replican eficazmente pero a las que no causan enfermedad. Ocasionalmente, estos virus son transmitidos a la población humana dando lugar a pandemias de gran impacto, como la de 1918, conocida como “gripe española”, que causó entre 20 y 40 millones de muertos en todo el mundo. La gran variabilidad viral está asociada a sus características genéticas: un genoma segmentado, 16 clases de glicoproteínas de membrana HA y 9 clases de NA, y ausencia de actividad correctora de errores en su polimerasa. Estas características, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, han hecho de estos virus uno de los patógenos conocidos que más morbilidad y mortalidad han causado en la historia.

Pese a que los estudios virológicos que permiten determinar el subtipo causante de la enfermedad tuvieron su punto de partida en el aislamiento del virus en 1933, no ha sido hasta hace algunos años cuando se ha podido caracterizar el virus H1N1 de la epidemia de 1918, gracias a tejidos preservados de víctimas (Gibbs et al, 2001a; Gibbs et al, 2001b). La epidemia de 1957 o “gripe asiática” fue causada por el subtipo H2N2, cuya secuenciación reveló que contenía genes procedentes de una cepa aviar (Kawaoka et al, 1989). Once años más tarde un nuevo subtipo H3N2 (cepa “Hong-Kong”) causó la epidemia de 1968, cuyo origen

también se atribuye a una recombinación entre virus humanos y aviares. En Diciembre de 1997 apareció un nuevo subtipo aviar H5N1 proveniente de aves importadas de China que amenazaba con generar una nueva pandemia (Hatta et al, 2001). Sin embargo, a pesar de su elevada mortalidad, este virus aun no ha adquirido la capacidad de transmitirse entre humanos. Cuando aún se pensaba en la posible pandemia de gripe aviar, un nuevo subtipo de origen porcino, el H1N1, se extiende desde Méjico. La noticia saltó el pasado 13 de Abril y el 11 de Junio la OMS declaraba el nivel de alerta 6: Pandemia. A diferencia del virus aviar H5N1, este subtipo se caracteriza por su alta transmisibilidad entre la población humana. Esta característica, junto con la globalización actual, han propiciado la expansión del virus por todo el mundo en un tiempo record. Por el momento, el nuevo virus no parece ser tan devastador como el H5N1, aunque habrá que esperar algunos años para valorar las consecuencias de la primera pandemia de gripe del siglo XXI.

Todos estos hechos hacen que tanto el estudio a nivel molecular como el control epidemiológico del virus sean de una gran importancia e interés.

2. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

El virus de la gripe pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, estos virus poseen envuelta lipídica y un genoma segmentado de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. La familia *Orthomyxoviridae* incluye varios géneros: *Influenzavirus A*, que infecta humanos, otros mamíferos y una gran variedad de aves; *influenzavirus B*, que únicamente infecta humanos; *influenzavirus C*, que infecta humanos, perros y cerdos; *Thogoto-like virus* que incluye los virus Thogoto y Dhori, que infecta garrapatas; y el género *Isavirus*, cuya especie más importante es el virus de la anemia del salmón.

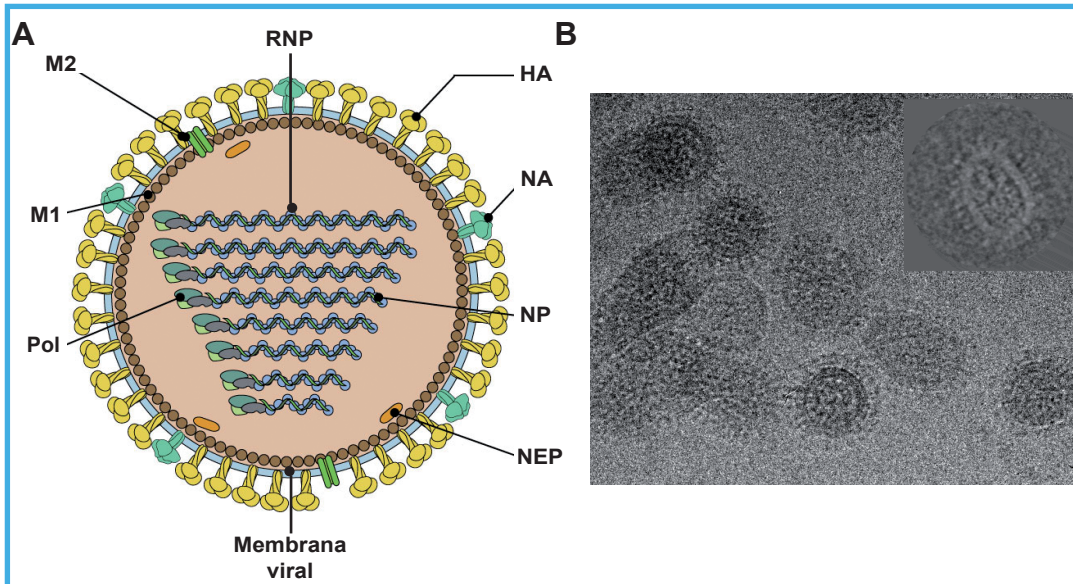


Figura 11. El virus de la gripe. (A) Representación esquemática de una partícula viral. El virión está compuesto por 9 de las 11 proteínas que codifica su genoma. Se muestran las 2 glicoproteínas de membrana, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el canal iónico M2, la proteína matriz M1, la proteína NEP, las ocho RNPs (compuestas por el RNA, la NP y el complejo de la polimerasa, formado por las subunidades PA, PB1 y PB2) y la membrana del virus. (B) Micrografía de viriones purificados obtenida por criomicroscopía electrónica. Sección de un tomograma en la que se observa en detalle el interior de un virión reconstruido con esta muestra.

Los distintos subtipos se caracterizan por los cambios en la estructura de los dos antígenos de superficie más importantes del virus, las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Los virus clínicamente relevantes en humanos son los tipo A y B, siendo los del tipo A los únicos que han producido pandemias a lo largo del siglo XX. A lo largo de esta Tesis se va a hacer referencia únicamente a cepas de virus tipo A, ya que es el que más severamente afecta a humanos y mejor se conoce.

3. LA PARTÍCULA VIRAL

Las partículas virales son pleomórficas y heterogéneas, aunque con tendencia a adquirir formas esféricas, ovaladas o filamentosas dependiendo de la cepa y el tipo de célula hospedadora (Horne et al, 1960; Hoyle et al, 1961). Se caracterizan por tener una envuelta lipídica, derivada de la membrana plasmática de las células infectadas (Compans & Chopin,

1975), en la que se encuentran ancladas las glicoproteínas virales HA y NA formando espículas radiales de 10-14 nm (Fig. 11B). Los viriones tienen un diámetro de entre 80 y 120 nm, aunque los filamentosos, que son los más frecuentemente observados en preparaciones clínicas, pueden llegar hasta los 300nm.

PROTEÍNAS VIRALES

En la envuelta del virión se encuentran las glicoproteínas de membrana HA y NA. La proteína HA forma un homotrímero y su estructura alargada termina en una forma globular (Fig. 11A). Las funciones más importantes de HA son el reconocimiento del receptor celular del virus, el ácido siálico, y la fusión con la membrana celular (Weis et al, 1988). La proteína NA es un homotetrámero con forma de bastón (Colman et al, 1983; Varghese et al, 1983) y su función es eliminar el ácido siálico presente en las glicoproteínas de la membrana celular, permitiendo la liberación de los nuevos viriones

al espacio extracelular. Dentro de los virus tipo A se han descrito 16 subtipos de HA y 9 de NA. La combinación de los distintos subtipos de HA y NA determina la variabilidad viral (WHO, 1980), y afecta al rango de hospedador y la patogenicidad de las distintas cepas (Nicholls et al, 2008; Yamada et al, 2006). En la envuelta del virión también se encuentra anclada la proteína **M2** (Fig. 11A) (Zebedee & Lamb, 1988) cuya estructura biológicamente activa es un tetrámero que forma un canal iónico (Bauer et al, 1999; Holsinger & Lamb, 1991; Pinto et al, 1992). Su función principal es permitir el paso de protones de los endosomas al virus. La proteína M2 también está implicada en la alteración de la proporción de partículas filamentosas y esféricas (Roberts et al, 1998) y en el ensamblaje y liberación de viriones (Hughey et al, 1995; Schroeder et al, 2005). La proteína **M1** es la más abundante del virión (Fig. 11A) y la más conservada evolutivamente. Forma una malla

estructural por debajo de la envuelta lipídica que conecta los componentes del interior del virus con las proteínas de la envuelta (Nayak et al, 2004). Una de sus superficies es altamente hidrofóbica, lo que permite que interaccione con membranas, mientras que la superficie opuesta está cargada positivamente (Sha & Luo, 1997) y probablemente interaccione con el RNA (Ye et al, 1989; Ye et al, 1987). La proteína M1 interacciona con las RNPs y con la proteína NEP. Se ha propuesto que M1 tiene un papel clave en el ensamblaje de los viriones reclutando los componentes virales al lugar de ensamblaje en la membrana plasmática. La proteína **NEP** (antiguamente denominada NS2) es poco abundante en el virión, interacciona con el receptor de exportación nuclear CRM1 (Neumann et al, 2000) y con varias nucleoporinas (O'Neill et al, 1998). La proteína NEP también interacciona con M1, sugiriendo que la exportación de las RNPs progenie del núcleo se realice mediante el

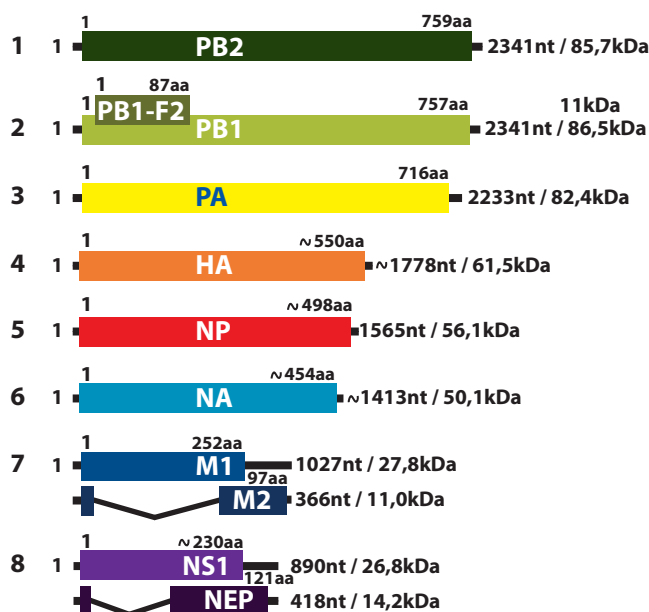


Figura 12. Estructura del genoma del virus de la gripe. Los RNAs se representan en polaridad positiva y se muestran las proteínas que codifican. Las líneas negras representan los extremos no codificantes de cada segmento. Los intrones se representan como líneas en forma de V en los segmentos M y NS. A la izquierda se muestra el número de segmento y a la derecha su longitud en nucleótidos y la masa molar de las proteínas que codifican (Adaptado de Fields et al. (Palese & Shaw, 2007; Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

complejo RNP-M1-NEP (Yasuda et al, 1993). En el interior de la matriz estructural se encuentra el genoma segmentado del virus, compuesto por ocho ribonucleoproteínas (**RNPs**) (Fig. 11A), que contienen un total de aproximadamente 13500 nucleótidos. Estas ocho moléculas de RNA genómico codifican once proteínas (Fig. 12), gracias a mecanismos de procesamiento alternativo (*splicing*) de los segmentos 7 y 8 (Lamb & Choppin, 1979; Lamb et al, 1981) y a la utilización de una fase de lectura abierta (ORF) alternativa del mRNA del segmento 2 (Chen et al, 2001) (Fig. 12). Las RNPs están compuestas por un segmento de RNA genómico superenrollado (Hsu et al, 1987) tapizado en toda su longitud por la nucleoproteína (**NP**) (Klumpp et al, 1997) y un complejo de polimerasa viral, que tiene tres subunidades: **PB1**, **PB2** y **PA**. Estas RNPs forman las unidades básicas funcionales que llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción en el núcleo de la célula infectada. Las RNPs y sus componentes se describen en mayor detalle más adelante.

Las proteínas **NS1** y **PB1-F2** se expresan durante la infección viral pero por el momento no se han detectado en el virión. La proteína NS1 está implicada en diferentes funciones: a) Modulación del proceso de *splicing*: Los segmentos 7 y 8 del virus de la gripe producen 2 proteínas cada uno, por lo que requieren un procesamiento post-transcripcional para su correcta expresión (Lamb et al, 1980; Lamb et al, 1981). Además NS1 inhibe el *splicing* de los mRNAs celulares, y el de su propio mRNA (Garaigorta & Ortín, 2007; Qiu et al, 1995); b) Inhibición del procesamiento 3' de los pre-mRNAs: NS1 impide la maduración de los mRNAs celulares inhibiendo el corte y poliadenilación del extremo 3' (Chen et al, 1999). El procesamiento de los mRNAs virales no se ve afectado porque el mecanismo es distinto (Poon et al, 1998; Poon et al, 1999); c) Inhibición del transporte de mRNAs: NS1 promueve la retención nuclear de mRNAs celulares poliadenilados que se transcriben

bajo el control de la RNA polimerasa II (Fortes et al, 1994); d) Modulación de la actividad de la polimerasa viral: NS1 interacciona con el RNA viral (Hatada & Fukuda, 1992; Hatada et al, 1997; Hatada et al, 1992) y con la polimerasa viral y/o las RNPs (Marión et al, 1997); e) Estimulación de la traducibilidad de los mRNAs virales: Durante la infección viral se favorece la traducción de proteínas virales (Park & Katze, 1995). Se han descrito diferentes mecanismos para explicar este proceso: como la unión de NS1 al extremo 5'UTR del mRNA viral (Garfinkel & Katze, 1993), y su interacción con el factor de traducción eif4G (Aragón et al, 2000; de la Luna et al, 1995); f) Morfogénesis viral (Garaigorta et al, 2005); g) Inhibición de la maquinaria de defensa celular. NS1 impide la activación de la PKR a través de su unión a RNAs de doble cadena o dsRNA (Cheng et al, 2009) y la interacción directa entre NS1 y PKR (Hatada et al, 1999; Tabor, 1987). NS1 inhibe el sistema de silenciamiento celular mediado por RNA interferente (Bucher et al, 2004; Li et al, 2004), previene la activación del sistema 2'-5'OAS/RNAsaL (Min & Krug, 2006), y la transcripción de los factores IRF3, IRF7, NFκB y Jun/ATF2 mediante la unión a RIG-I (Guo et al, 2006; Mibayashi et al, 2007; Pichlmair et al, 2006). NS1 es fundamental para la inhibición de la respuesta mediada por interferón que se desencadena en la célula huésped tras ser infectada con el virus (Kochs et al, 2007).

La proteína PB1-F2 se localiza en la membrana de las mitocondrias y se ha demostrado que induce apoptosis (Gibbs et al, 2003). Esta proteína es un factor importante de patogenicidad (Zamarin et al, 2006) ya que favorece la aparición de enfermedades bacterianas secundarias (McAuley et al, 2007) y además regula la actividad de la polimerasa mediante la interacción con la subunidad PB1 (Mazur et al, 2008).

4. RNAS VIRALES

El genoma del virus de la gripe está formado por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa cuya longitud oscila entre 2341 y 890 nt.. Cada segmento presenta unas secuencias conservadas de 12 y 13 nucleótidos en sus extremos 3' y 5' respectivamente (Desselberger et al, 1980; Robertson, 1979) que poseen complementariedad parcial e invertida. Este hecho les permite aparearse y formar una estructura que conforma el promotor para los procesos de replicación y transcripción viral y es la región del RNA a la que se une la polimerasa (Fodor et al, 1994; Fodor et al, 1993; Honda et al, 1987). Además, secuencias no conservadas dentro de las regiones no codificantes se han visto relacionadas con la regulación de la eficiencia de transcripción/replicación (Zheng et al, 1996). Tras el estudio de la estructura de los terminales de los RNAs mediante predicciones de su plegamiento, experimentos de mutagénesis y de resonancia magnética nuclear, se han propuesto varios modelos de estructura secundaria de los promotores de vRNA y cRNA (Fig. 13): mango de sartén o *panhandle* (Bae et al, 2001; Baudin et al, 1994; Desselberger et al, 1980; Hsu et al, 1987; Lee et al, 2003; Robertson, 1979); tenedor o *RNA-fork*, estructura híbrida entre RNA de doble cadena y RNA de cadena sencilla (Fodor et al, 1995; Kim et al, 1997) y sacacorchos o *corkscrew*, basada en la de RNA-fork, en la que cada uno de los extremos del RNA forma una estructura de *hairpin loop* (Flick & Hobom, 1999; Flick et al, 1996). A la vista de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos, se ha propuesto la conformación cerrada (*panhandle*) para el correcto reconocimiento de la polimerasa, seguida de la conformación abierta (*fork* o *corkscrew*) mediante la separación del híbrido de RNA por parte de la polimerasa. Sin embargo el esclarecimiento final de esta estructura no será posible hasta que se determine la estructura atómica del complejo de la polimerasa asociado al molde.

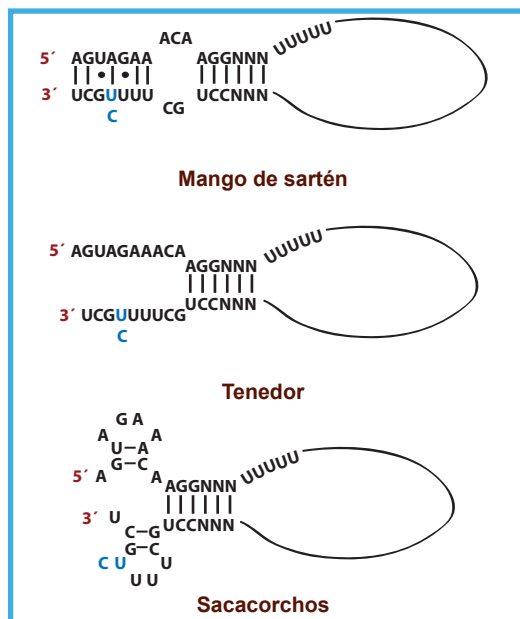


Figura 13. Modelos de la estructura secundaria propuesta para el promotor viral. Se representan los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del RNA que conforman el promotor viral (Adaptado de Fields et al. (Palese & Shaw, 2007)).

Durante la infección por el virus de la gripe, dentro de la célula infectada, se pueden encontrar tres tipos de RNAs virales distintos, todos ellos generados por el complejo de la polimerasa viral (Fig. 14):

vRNAs o RNAs GENÓMICOS: Son los RNAs de las RNPs paternas y los que se encapsidan para dar lugar a las RNPs progenie. Sus extremos 5' y 3' poseen un trifosfato y un OH respectivamente (Young & Content, 1971). Los vRNAs contienen además una zona rica en uridinas próxima al extremo 5' que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs virales (Luo et al, 1991; Robertson, 1979). El vRNA siempre se encuentra encapsidado por la proteína NP formando vRNPs.

CRNAS o RNAs COMPLEMENTARIOS: Son una copia completa de polaridad positiva del vRNA producido mediante el proceso de replicación. Los cRNAs son RNAs intermediarios de la replicación viral, ya que se utilizan como

molde para generar copias de vRNA que serán incorporadas más tarde a la progenie viral. Al igual que el vRNA, el cRNA se encuentra formando cRNPs, pero a diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo de la célula infectada y no se encapsidan en los nuevos viriones.

MRNAS O RNAs MENSAJEROS: Son generados durante los procesos de transcripción a partir de moléculas de vRNA. Tienen polaridad positiva y presentan en su extremo 5' una estructura *cap* tipo 1 que deriva de mRNAs celulares (Krug et al, 1979) y en su extremo 3' una secuencia poliA de longitud variable. Dichas modificaciones post-transcripcionales dan lugar a mRNAs virales estructuralmente indistinguibles de los celulares.

LA RIBONUCLEOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA GRIPE

Los segmentos de RNA virales no existen como RNAs desnudos sino que se encuentran asociados a la RNA polimerasa viral y a moléculas de nucleoproteína o NP, dando lugar

a las ribonucleoproteínas o RNPs (Portela et al, 1999). La longitud de cada RNP depende del segmento viral del que se trate, desde 50 a 130 nm, manteniendo un diámetro de unos 10 nm (Noda et al, 2006). Algunos trabajos han evidenciado la naturaleza flexible de las RNPs dependiendo del ambiente en el que se encuentren, lo cual se podría relacionar con distintos estadios funcionales (Heggeness et al, 1982). La estructura de las RNPs ha sido estudiada en detalle mediante microscopía electrónica, observándose formas helicoidales en las que las moléculas de NP forman un oligómero con una clara vorticidad (Compans et al, 1972; Ortega et al, 2000; Ruigrok & Baudin, 1995). Este oligómero actuaría a modo de esqueleto para la unión del RNA, cuyas bases están expuestas y son accesibles a RNAsas y modificaciones por agentes químicos, excepto los extremos que están protegidos por la unión de la polimerasa (Baudin et al, 1994). De esta manera, la polimerasa podría leer las bases sin necesidad de que la RNP se disocie (Baudin et al, 1994; Ruigrok & Baudin, 1995). En el año 2001, Martín Benito et al. publicaron la estructura tridimensional de una RNP recombinante del virus de la gripe (Martín-Benito et al, 2001) (Fig. 15B). Esta estructura se obtuvo mediante

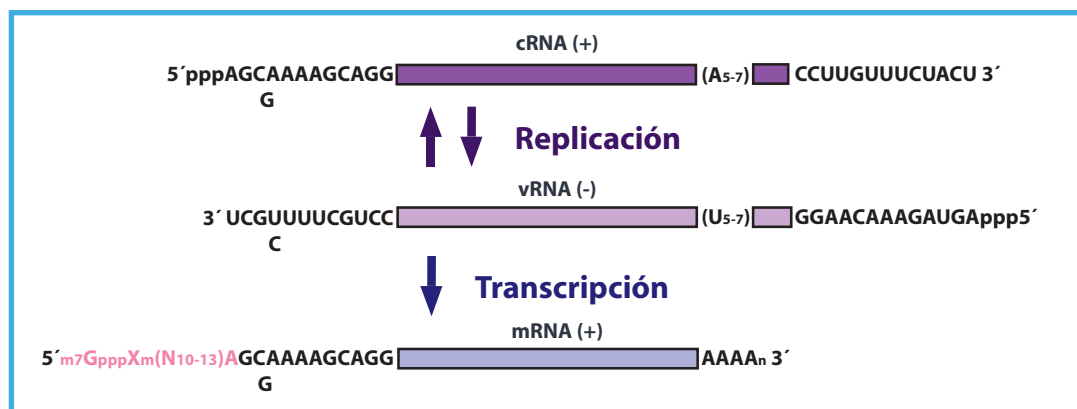


Figura 14. Diagrama de la síntesis de RNA viral. El RNA genómico de polaridad negativa se muestra en morado. Mediante un proceso de transcripción se generan los mRNAs virales. El mRNA viral, representado en azul claro, contiene una estructura cap que proviene de mRNAs celulares y un extremo poliA sintetizado por la polimerasa viral. Mediante un proceso de replicación se generan los intermediarios replicativos (cRNA representado en añil) que sirven como molde para dar lugar a la progenie viral (vRNA).

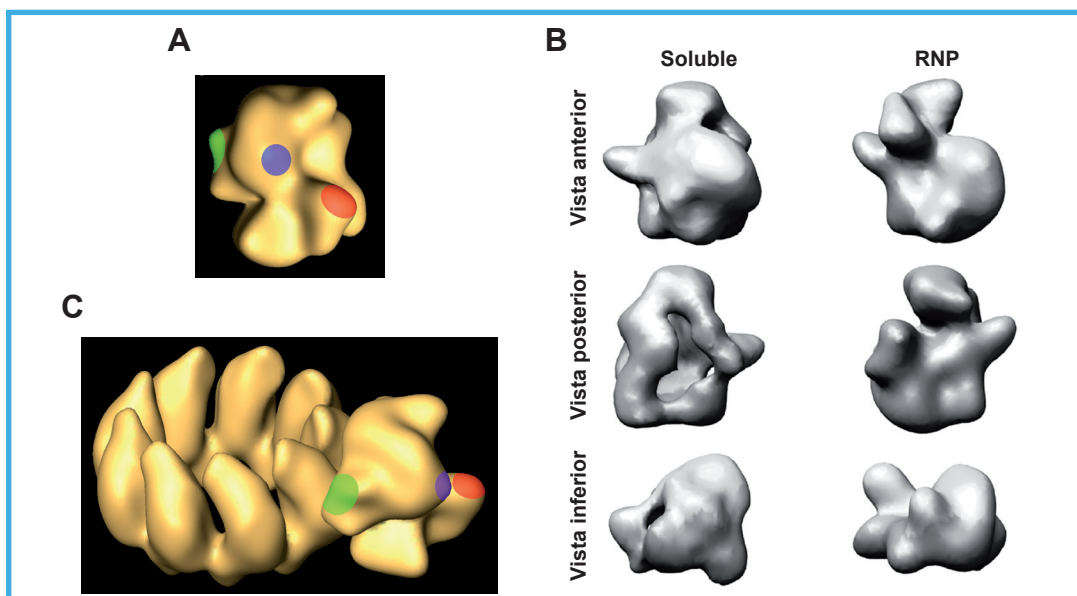


Figura 15. Modelo tridimensional de la polimerasa viral y la RNP. (A) Localización de las subunidades de la polimerasa en la polimerasa de la RNP (Area et al, 2004) . (B) Modelo tridimensional de la RNP (Martín-Benito et al, 2001). (C) Modelo estructural de la polimerasa soluble (soluble) y de la polimerasa unida a la RNP (RNP) (Torreira et al, 2007).

microscopía electrónica de tinción negativa y procesamiento de imágenes, y corresponde a RNPs recombinantes biológicamente activas de nueve monómeros de NP. Actualmente se han publicado las estructuras atómicas de RNPs de otros virus (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006), pero ninguna de ellas posee el complejo de la polimerasa, por tanto no son estructuras biológicamente activas.

1. LA POLIMERASA VIRAL

La polimerasa viral es una RNA polimerasa dependiente de RNA formada por las subunidades PA, PB1 y PB2 (Detjen et al, 1987; Digard et al, 1989) en una relación estequiométrica 1:1:1 (Detjen et al, 1987; Honda et al, 1990; Kato et al, 1985) (Fig. 15A y 6). La subunidad PB1 forma el núcleo central de la polimerasa y está flanqueada en su extremo N-terminal por PA y en su extremo C-terminal por PB2 (Biswas & Nayak, 1996; Ohtsu et al, 2002; Poole et al, 2004). Recientemente se ha detectado la interacción entre PB2 y PA (Hemerka et al, 2009). La estructura de la polimerasa obtenida

mediante microscopía electrónica indica que las 3 subunidades se encuentran asociadas y formando una estructura compacta (Area et al, 2004; Torreira et al, 2007) (Fig. 15A). La cristalización del complejo de la polimerasa no ha sido posible por el momento, aunque se dispone de la estructura atómica de diferentes dominios de las subunidades (Dias et al, 2009; Guilligay et al, 2008; Guu et al, 2008; He et al, 2008; Tarendeau et al, 2007; Tarendeau et al, 2008; Yuan et al, 2009). Las tres subunidades son necesarias para llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral en el núcleo de las células infectadas (Perales & Ortín, 1997). Además de la polimerasa presente en las vRNPs, también se ha descrito la presencia de polimerasa soluble en el núcleo de células infectadas (Detjen et al, 1987), si bien no se ha detectado su presencia en los viriones.

PB1

La subunidad PB1 es una de las dos proteínas básicas del complejo, la más conservada evolutivamente y la polimerasa propiamente

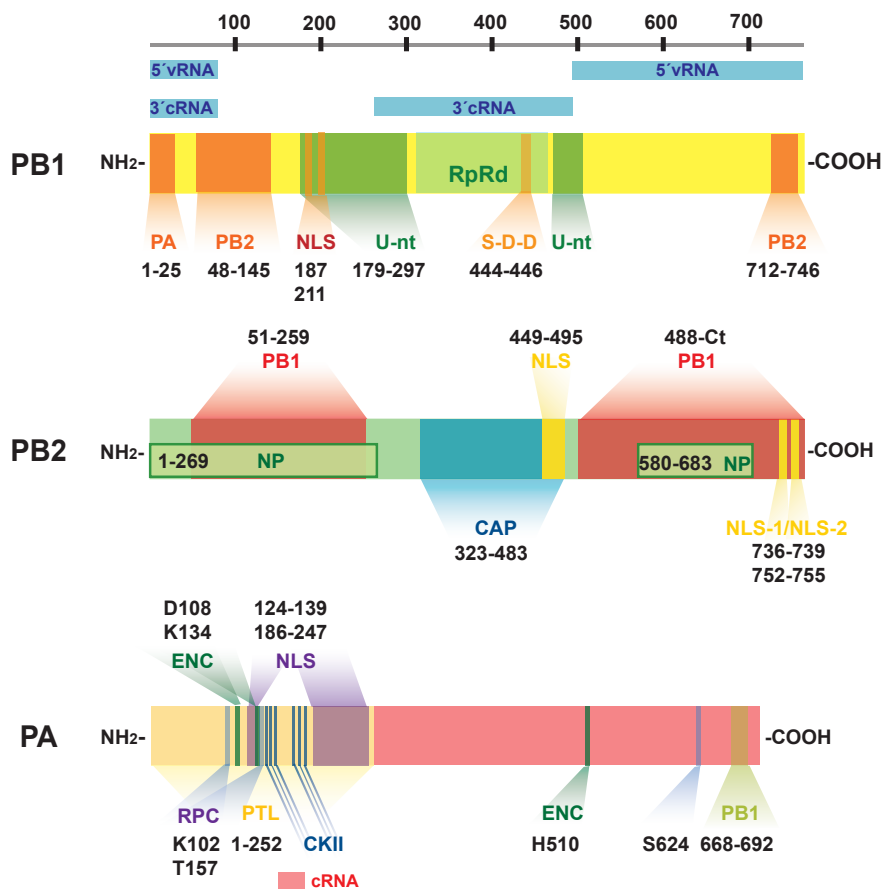


Figura I6. Dominios funcionales de las subunidades de la RNA polimerasa viral. Se representan las tres subunidades de la polimerasa viral. Los primeros 25 aminoácidos de la región Nt de PB1 interactúan con PA. La región Ct de PB1 interacciona con la región Nt de PB2 (González et al, 1996; Ohtsu et al, 2002; Poole et al, 2007). Además, se han descrito dos regiones adicionales de interacción entre PB1 y PB2: la región Nt de PB1 (Biswas & Nayak, 1996) y la región Ct de PB2 (Poole et al, 2004). La región Nt de PA interacciona con PB2 (Hemerka et al, 2009). Las regiones de PB1 responsables de la interacción con el 5'vRNA comprenden los residuos Nt 1-83 y Ct 494-757 (González & Ortín, 1999). La subunidad PB1 interacciona con el cRNA mediante sus residuos centrales 266-493 aunque los residuos 1-83 también están implicados. PA interacciona con el cRNA (Maier et al, 2008). **NLS:** señal de localización nuclear; **U-nt:** zona de unión a nucleótido; **S-D-D:** residuos característicos de una RNA polimerasa RNA dependiente (**RpRd**); **ENC:** actividad endonucleasa; **CAP:** dominios de unión a estructuras cap; **CKII:** dianas de fosforilación por casein quinasa II; **RPC:** residuos implicados en replicación; **PTL:** actividad proteolítica (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

dicha (Braam et al, 1983; Ulmanen et al, 1981). Actúa como nucleódel complejo, interactuando de manera independiente con PB2 y PA (Biswas & Nayak, 1996; Digard et al, 1989) y uniendo también NP (Biswas et al, 1998; Medcalf et al, 1999). Posee cinco motivos comunes a todas las RNA polimerasas dependientes de RNA, incluyendo la secuencia de doble aspártico invariable y presente en todas las polimerasas (Kobayashi et al, 1996) (Poch et al, 1990) (Fig.

16), y mutaciones puntuales en estos residuos afectan dramáticamente su actividad (Biswas & Nayak, 1994; Mahy, 1983). Adyacentes a esta región catalítica se han descrito dos sitios de unión a nucleótido que se han propuesto como dos sitios implicados en la adición de nucleótidos durante la síntesis de RNA (Asano & Ishihama, 1997; Kolpashchikov et al, 2004). La polimerasa viral se asocia al promotor del vRNA con especificidad de secuencia (Tiley et al, 1994),

y PB1 contribuye a esta interacción (Fodor et al, 1994; Li et al, 1998). Concretamente, PB1 une de manera específica y diferencial los RNAs virales (González & Ortín, 1999b). La región 5' del vRNA se une a dos regiones situadas entre los aminoácidos 494 a 757 y entre los aminoácidos 1 y 83 (González & Ortín, 1999a). Se ha observado que el extremo 5' del vRNA interacciona con PB1 con mayor afinidad que el extremo 3', y a su vez mayor afinidad por vRNA que por cRNA (González & Ortín, 1999a; González & Ortín, 1999b), pero a diferencia del vRNA, los extremos 5' y 3' del cRNA unen PB1 con la misma afinidad (González & Ortín, 1999b), sugiriendo un cambio conformacional de la proteína para la unión a vRNA o a cRNA (González & Ortín, 1999b). Por otra parte, PB1 posee una señal de localización nuclear (NLS) bipartita localizada entre los residuos 187-195 y 203-216 y que está compuesta por aminoácidos cargados (Nath & Nayak, 1990) (Fig. 16). Por último, se ha sugerido que la subunidad PB1 podría tener un papel en la regulación de la transcripción ya que mutaciones en esta subunidad afectan la unión al promotor viral del vRNA y la unión a RNA con estructuras *cap* (Kerry et al, 2008).

PB2

La subunidad PB2 tiene un papel fundamental en la transcripción ya que es la responsable del reconocimiento de estructuras *cap* tipo 1 de los pre-mRNAs de la célula huésped, que serán posteriormente cortadas y utilizadas como cebadores para la síntesis de los mRNAs virales (Blaas et al, 1982; Braam et al, 1983; Shi et al, 1996; Ulmanen et al, 1981). La proteína PB2 se recluta al complejo de la polimerasa por interacciones proteína-proteína con la subunidad PB1 (Digard et al, 1989; Poole et al, 2004) también interacciona directamente con NP (Biswas et al, 1998; Medcalf et al, 1999; Poole et al, 2004) y con PA (Hemerka et al, 2009). Numerosos estudios han tratado de determinar la región de PB2 implicada en la unión a *cap*

(Fechter et al, 2003; Honda et al, 1999; Li et al, 2001). En el año 2008 Guilligay et al. pusieron fin a las controversias determinando el dominio responsable del reconocimiento y unión de *cap*, localizado entre los residuos 323 y 483 (Fig. 16), mediante la obtención de la estructura atómica del dominio unido a 7metil-GTP y ensayos de mutagénesis (Guilligay et al, 2008). La proteína PB2, además de estar implicada en transcripción, tiene también un papel en la replicación viral dado que mutantes puntuales en esta proteína dan lugar a defectos en la replicación pero no en la transcripción (Gastaminza et al, 2003). Al igual que PB1, PB2 es capaz de unir el RNA genómico, aunque se desconoce cual es la región responsable del reconocimiento (Fodor et al, 1993). Por otro lado, PB2 posee una NLS bipartita localizada entre los aminoácidos 736-759 (Mukaigawa & Nayak, 1991). Esta NLS es importante para interacción con la importina $\alpha 5$ (Resa-Infante et al, 2008), ya que mutaciones en dicha región impiden la localización nuclear de PB2 (Tarendeau et al, 2007) y reduce la actividad de las RNPs (Resa-Infante et al, 2008), sugiriendo que las importinas, además de ejercer una función de importación nuclear, tienen un papel en la replicación viral. Además se ha observado que la interacción de PB2 con importinas parece ser específica de especie, por lo que podría ser un factor determinante de rango de hospedador (Gabriel et al, 2005; Gabriel et al, 2008; Resa-Infante et al, 2008).

PA

Hasta hace muy poco a esta subunidad se le asignaban funciones de ayuda o apoyo, pero se desconocía la función específica de PA. Recientemente se ha publicado que el dominio N-terminal de PA tiene actividad nucleasa y que su estructura es muy parecida a las nucleasas de tipo II (Dias et al, 2009; Yuan et al, 2009). Por tanto, la subunidad responsable del corte endonucleotídico es PA y no PB1, como se había descrito anteriormente (Li et al, 1998).

Además PA está implicada en replicación viral, ya que mutantes termosensibles en PA dan lugar a defectos en la síntesis de cRNA y vRNA (Krug et al, 1975). Se ha observado que PA está implicada también en la unión de la polimerasa a estructuras *cap* (Hara et al, 2006) y que es necesaria para la estabilización de la interacción entre el promotor y la polimerasa (Deng et al, 2005; Hara et al, 2006; Lee et al, 2002), ya que mutaciones en PA desestabilizan la interacción entre la polimerasa y el molde viral dando lugar a la generación de RNAs interferentes (Fodor et al, 2003). Del mismo modo que PB1 y PB2 interaccionan con el promotor viral, se ha descrito que PA interacciona con el extremo 5' del vRNA (Fodor et al, 1994) y con el cRNA (Maier et al, 2008). Por otra parte, PA es una proteína fosforilada *in vivo* y susceptible de fosforilación *in vitro* por casein kinasa II (Sanz-Ezquerro et al, 1998). Se ha demostrado que PA tiene capacidad proteolítica sobre sí misma y sobre las proteínas que se expresan con ella (Sanz-Ezquerro et al, 1995). Esta capacidad reside también en el tercio N-terminal de la proteína, sin embargo esta región no tiene homología con otras proteasas conocidas (Sanz-Ezquerro et al, 1996). Por otra parte, se ha descrito que PA es una serín-proteasa y el residuo S624 es importante en esta actividad (Hara et al, 2001). La capacidad para inducir proteólisis está relacionada con la

capacidad de síntesis de cRNA (Huarte et al, 2003; Perales et al, 2000). Del mismo modo que las otras dos subunidades, PA posee una NLS dividida en dos regiones situadas en el extremo N-terminal (Nieto et al, 1994) (Fig. 16).

2. LA NUCLEOPROTEÍNA

La NP es la proteína más abundantemente sintetizada durante la infección. Es una proteína de 498 aminoácidos con una carga neta positiva a pH neutro (Portela & Digard, 2002). La estructura de la NP está compuesta por dos dominios, cabeza y cuerpo (Fig. 17A). El dominio superior está formado por los aminoácidos 150-272 y 438-452, mientras que el dominio inferior comprende tres segmentos polipeptídicos, 21-149, 273-396 y 453-489 (Ye et al, 2006). Así pues el plegamiento y la topología de la NP del virus de la gripe es diferente de las NPs de los Rhabdovirus, en las que los dos dominios están formados por secuencias colineales (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006). Sin embargo un análisis comparativo de las tres estructuras atómicas revela que poseen dominios estructurales comunes, en concreto 5 α -hélices en la región N-terminal y 3 α -hélices en la región C-terminal, sugiriendo características comunes para el empaquetamiento del genoma de los

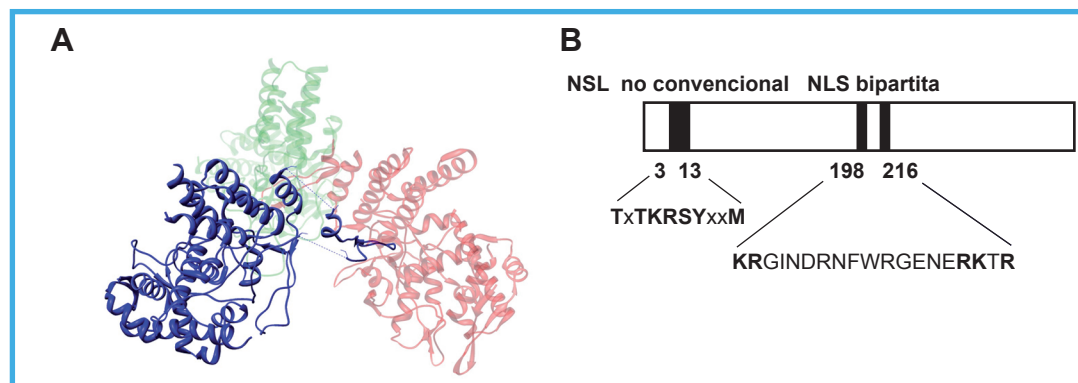


Figura 17. La nucleoproteína. A) Estructura atómica del trímero de NP. Se muestran los 3 monómeros de NP presentes en el cristal, uno de ellos se ha resaltado para poder observar el lazo de unión que se introduce en la estructura del monómero adyacente (adaptado de (Ye et al, 2006)). B) Representación esquemática de NP. Se indican las posiciones relativas de las señales de localización nuclear (NLS) (Adaptado de Fields et al. (Palese & Shaw, 2007)).

virus de banda negativa (Luo et al, 2007). Se ha propuesto una región situada entre los dos dominios, cabeza y cuerpo, como la responsable de la unión del RNA (Ye et al, 2006). Esta región se encuentra en la superficie exterior de la NP, al contrario que en los Mononegavirales, lo que explicaría que la RNP de gripe es sensible a RNAsas mientras que las de los Mononegavirales no lo son. La oligomerización de la NP del virus de la gripe está mediada por un lazo flexible, formado por los aminoácidos 402-428 que se inserta en el monómero siguiente (Fig. 17A). Mutaciones puntuales en este lazo impiden la oligomerización de la NP (Ye et al, 2006). La NP posee dos señales de localización celular (NLS): una no convencional situada en el N-terminal de la proteína entre los aminoácidos 1-13 (Wang et al, 1997), y otra NLS bipartita situada en centro de la proteína que comprende los aminoácidos 198-216 (Weber et al, 1998) (Fig. 17B). Estas dos señales reclutan la NP al núcleo para formar las RNPs y obligan a estas a permanecer en el (Wu et al, 2007). La NP encapsida el RNA viral formando la RNP, a razón de una molécula de NP cada 24 nucleótidos (Compans et al, 1972; Martín-Benito et al, 2001; Ortega et al, 2000). De manera que podemos encontrar RNPs desde 37 NPs (890 nt) hasta 97 NPs (2341 nt). La interacción con el RNA es cooperativa y no específica de secuencia (Baudin et al, 1994; Yamanaka et al, 1990). Se ha comprobado que la NP tiende a oligomerizar tanto *in vivo* como *in vitro* y que el tratamiento con RNAsa respeta la forma helicoidal de la RNP (Murti et al, 1980; Ruigrok & Baudin, 1995). Por otro lado, NP interacciona con la polimerasa a través de las subunidades PB1 y PB2, pero no con PA (Area et al, 2004; Biswas et al, 1998). La NP es necesaria para el proceso de replicación (Portela & Digard, 2002), ya que polimerasas libres de NP son capaces de transcribir oligonucleótidos, pero no de sintetizar RNAs largos (Honda et al, 1988). Otros autores han relacionado a esta proteína con el cambio de transcripción a replicación que sufre la polimerasa durante el ciclo viral, aludiendo a la necesidad de NP

soluble en el ambiente para que se produzca dicho cambio (Fodor et al, 1994; Klumpp et al, 1997). Se ha descrito también su interacción con M1, que promueve su exportación del núcleo (Martin & Helenius, 1991a) y se ha sugerido que está implicada en el ensamblaje de los viriones (Noton et al, 2009). NP es a su vez capaz de interactuar con receptores de importación nuclear (O'Neill et al, 1995) a través de sus señales NLS, con la exportina I (CRM1) a través de la señal de exportación nuclear (NES) (Neumann et al, 1997), y con elementos del citoesqueleto celular para llevar a cabo el tráfico de RNPs (Avalos et al, 1997; Digard et al, 1999; Momose et al, 2007; Simpson-Holley et al, 2002) (Fig. 17C).

EL CICLO DE INFECCIÓN VIRAL

1. ENTRADA DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

El virus de la gripe infecta principalmente células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de mamíferos. La infección comienza con la adsorción de las partículas virales a su receptor celular, el ácido siálico, que es reconocido por la HA (Weis et al, 1988) presente en la envuelta del virión (Fig. 18-1). La entrada ocurre por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor y una vez formada la vesícula, se fusiona con lisosomas, acidificándose su interior y dando lugar a endolisosomas (Fig. 18-2). El bajo pH de las vesículas llega al interior del virión gracias al canal iónico formado por la proteína M2 (Helenius, 1992; Pinto et al, 1992). El pH ácido produce en el virión una desestabilización de la interacción de las RNPs con la proteína M1 y un cambio conformacional en la HA que favorece la fusión de la envuelta del virión y la membrana endolisosomal (Skehel et al, 1995; Stegmann et al, 1987a; Stegmann et al, 1987b). Todos estos eventos permiten la liberación de las RNPs al

citoplasma (Fig. 18-3), desde donde se dirigen al núcleo (Wang et al, 1997), donde tienen lugar los procesos de transcripción y replicación del genoma viral.

2. TRANSCRIPCIÓN, REPLICACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA

Tras la entrada de las RNPs al núcleo de la célula infectada tiene lugar un primer paso de transcripción (Fig. 18-4), la transcripción primaria, en el que se sintetizan cantidades similares de todos los mRNAs virales a partir de las vRNPs entrantes (Shapiro et al, 1987). Este paso no

precisa la síntesis de nuevas proteínas virales, los RNAs mensajeros generados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular (Fig. 18-5/6). Algunas proteínas virales sintetizadas son transportadas de regreso al núcleo (Fig. 18-7) donde intervendrán en la replicación de los vRNAs. En una primera ronda de replicación (Fig. 18-8) se producen cantidades equivalentes de los cRNAs de cada segmento, sin embargo la amplificación de los vRNAs a partir de estos moldes de cRNA ocurre de manera diferencial en cada segmento. La generación de los mRNAs a partir de estos vRNAs se da mediante la transcripción secundaria y su acumulación y

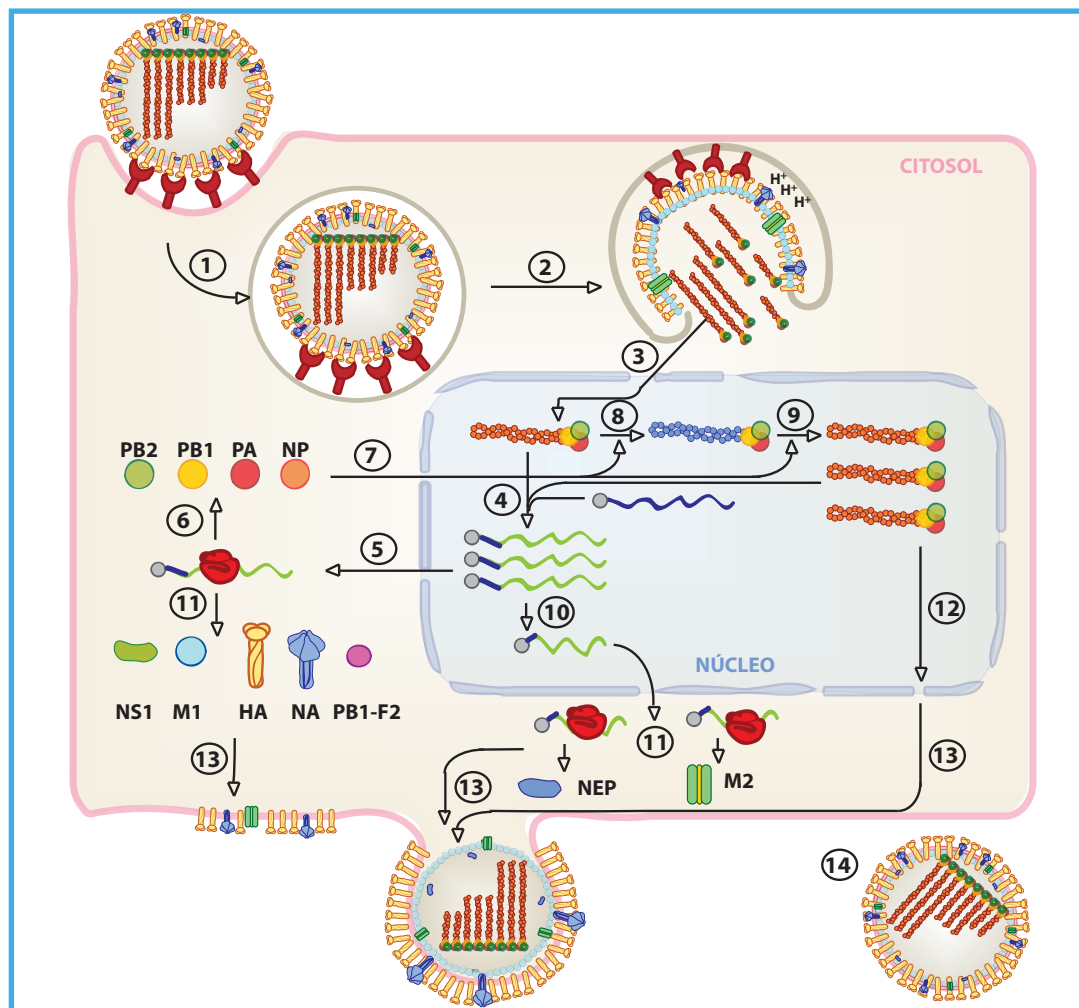


Figura 18. Ciclo de infección viral. Esquema de los pasos de la infección del virus de la gripe. Se representan los mRNAs celulares (en azul), los mRNAs virales (en verde), las cRNPs (en azul) y las vRNPs (en naranja) (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

la síntesis de las proteínas correspondientes son proporcionales a la acumulación del vRNA del que proceden (Hay et al, 1977; Krug et al, 1989; Smith & Hay, 1982). Este proceso es indistinguible de la transcripción primaria (Fig. I8-4/7). En este punto los procesos de replicación y transcripción secundaria están fuertemente acoplados, sin embargo según avanza la infección se desacoplan y las vRNPs presentes en el núcleo forman los nuevos viriones. Los procesos de transcripción y replicación viral están mecánicamente bien diferenciados. La iniciación de la transcripción depende de un donador de *cap* que actúa como cebador de la polimerasa, mientras que durante la replicación la polimerasa inicia *de novo* la síntesis del RNA. La transcripción implica la terminación prematura de la copia de vRNA en el proceso de poliadenilación, por el contrario la replicación da lugar a una copia completa y complementaria del molde utilizado (Hay et al, 1982). El producto de replicación es encapsidado por moléculas de NP (Pons, 1971), mientras que el producto de transcripción es un RNA desnudo.

3. PROCESAMIENTO DE LOS RNAs VIRALES Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Los productos de transcripción colineales del vRNA de los segmentos M y NS codifican las proteínas M1 y NS1 respectivamente. Sin embargo estos transcritos pueden ser procesados por la maquinaria de *splicing* (Inglis et al, 1979; Inglis & Brown, 1981; Lamb & Choppin, 1983; Lamb & Lai, 1980; Lamb et al, 1981), dando lugar a los mRNAs que codifican las proteínas M2 y NEP respectivamente. Aunque es la maquinaria de *splicing* de la célula huésped la que elimina los intrones correspondientes en estos segmentos, la polimerasa viral regula la selección del sitio 5' de *splicing* alternativo del mRNA del segmento M. En ausencia de polimerasa se genera el mRNA3, con una capacidad codificante de sólo 9 aminoácidos, y cuyo producto de traducción no ha sido identificado por el momento, pero en

presencia del complejo heterotrimérico, éste se une al sitio 5' de *splicing* de M3 y lo enmascara. De este modo, la maquinaria celular de *splicing* reconoce un sitio alternativo y genera el mRNA de M2 (Shih et al, 1995). El proceso de *splicing* se encuentra regulado de manera que la relación de acumulación de los mRNAs NS1/NEP y M1/M2 varía a lo largo de la infección, (revisado en (Palese & Shaw, 2007)).

Los mRNAs son exportados de manera muy eficiente, aunque el mecanismo de exportación no está claro. Se ha propuesto que la exportación del núcleo es independiente de la vía CRM1, y se lleva a cabo mediante la vía celular TAP/p15 con la participación de las proteínas NS1 y la RNA polimerasa II celular (Amorim et al, 2007; Wang et al, 2008). La traducción la lleva a cabo la maquinaria celular (Fig. I8-10/11), y parece que el virus toma el control traduccional estimulando la traducción de los mRNAs virales e inhibiendo la expresión de los mRNAs celulares, en un proceso conocido como *shut off* (Garfinkel & Katze, 1992; Katze & Krug, 1990; Krug et al, 1989).

4. FORMACIÓN Y SALIDA DE NUEVAS PARTÍCULAS VIRALES

En la fase tardía del ciclo de infección, entre 5 y 6 hpi, comienza la formación de nuevas partículas virales. Para ello, las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral y que han sido acumuladas en el núcleo (Fig. I8-9) deben ser transportadas al citosol a través del poro nuclear (Fig. I8-12). En este proceso intervienen la proteína M1, que hace de puente entre las vRNPs y NEP (Martin & Helenius, 1991b), la proteína NEP y la proteína NP de las vRNPs, que interaccionan con componentes del poro nuclear (Elton et al, 2001; O'Neill et al, 1998). Una vez en el citoplasma, las vRNPs viajan a la membrana plasmática a través de microfilamentos de actina (Fig. I8-13) (Avalos et al, 1997) y llegan a regiones concretas ricas en colesterol denominadas *lipid*

rafts (Ali et al, 2000) en las que previamente se han anclado las proteínas HA y NA y en menor medida M2 (Fig. I8-11) (Nayak et al, 2004; Scheiffele et al, 1999; Simpson-Holley et al, 2002). Se ha propuesto que la proteína M1 es el principal organizador del ensamblaje de los nuevos viriones (Gómez-Puertas et al, 1999; Gomez-Puertas et al, 2000), aunque otros trabajos también implican a M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006; McCown & Pekosz, 2006). Las partículas virales salen de la célula por gemación o *budding*, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica en la que se encontraban ancladas las proteínas virales de membrana (Fig. I8-13). Por último, la proteína NA degrada los receptores de ácido siálico que el virus ha arrastrado de la membrana celular, lo cual evita que se agreguen y permite su dispersión (Liu et al, 1995; Palese et al, 1974) (Fig. I8-14). El empaquetamiento del genoma viral requiere la incorporación de las 8 vRNPs para la generación de virus infecciosos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido que propone la selección de las 8 vRNPs que se incorporan. Recientemente se han identificado secuencias en *cis* presentes en las regiones codificantes y no codificantes en los extremos 5' y 3' de todos los genes, que son necesarias para el empaquetamiento (Fujii et al, 2005; Fujii et al, 2003; Liang et al, 2005; Liang et al, 2008; Muramoto et al, 2006; Noton et al, 2007; Ozawa et al, 2009; Watanabe et al, 2003). Además, mediante cortes seriados de viriones se ha observado una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central (Noda et al, 2006). Se cree que la vRNP central corresponde al segmento de PB2 ya que sus secuencias de empaquetamiento son necesarias tanto para la incorporación de su propio vRNA como para la incorporación del resto de vRNAs para la formación de virus infecciosos (Muramoto et al, 2006).

PROCESOS DE TRANSCRIPCIÓN Y REPLICACIÓN EN EL VIRUS DE LA GRIPE

1. TRANSCRIPCIÓN VIRAL

La polimerasa viral reconoce las estructuras *cap* de los pre-mRNAs celulares y mediante un proceso denominado *cap snatching* (Bouloy et al, 1978; Krug et al, 1979) los corta generando cebadores de 9-15 nt con extremos 5' *cap* y 3'-OH (Plotch et al, 1981), que utilizará para la iniciación de la transcripción. Se ha observado que el corte del mRNA celular se produce de manera preferencial después de una secuencia CA (Hagen et al, 1995; Plotch et al, 1981; Rao et al, 2003) siendo una G el primer nucleótido en incorporarse en todos los segmentos virales. La transcripción viral está acoplada obligatoriamente a la transcripción celular y drogas que inhiben la RNAPII, como el α -amanitina o la actinomicina D (Rott & Scholtissek, 1970), inhiben también la transcripción viral.

Hasta hace poco el modelo que se aceptaba para la transcripción del virus de la gripe se fundamentaba en una serie de cambios alostéricos inducidos por la unión del vRNA a PB1 (Cianci et al, 1995; Li et al, 1998). Estos cambios permitirían reconocer las estructuras *cap* de los pre-mRNAs celulares a PB2 y la activación de la actividad endonucleasa de PB1 que da lugar al corte de dichos pre-mRNAs (Cianci et al, 1995; Hagen et al, 1994; Leahy et al, 2001; Li et al, 1998) (Fig. I9). En este modelo la activación del corte endonucleotídico se produciría únicamente cuando ambos extremos del vRNA están unidos a la polimerasa (Hagen et al, 1994) y sería exclusivo de los extremos del vRNA (Cianci et al, 1995). De este modo el promotor del vRNA funcionaría como un cofactor esencial para la actividad de la enzima viral. Sin embargo, los nuevos datos obtenidos acerca de las funciones y características de la polimerasa viral exigen un

nuevo modelo de transcripción. La subunidad PB2 une *cap* independientemente del RNA y del resto de las subunidades de la polimerasa (Guilligay et al, 2008), si bien la unión al *cap* y la actividad endonucleotídica de PA son más eficientes cuando el complejo de la polimerasa se encuentra unido al RNA (Lee et al, 2003). Además, Rao et al, observaron que cuando el mRNA tiene un sitio de corte CA, el extremo 5' del vRNA adquiere la capacidad de activar tanto la unión a *cap* como el corte endonucleotídico, dejando al extremo 3' del vRNA únicamente la función de molde de la transcripción (Rao et al, 2003). La polimerasa viral lleva a cabo la elongación del cebador hasta llegar a la señal de poliadenilación. Permanece unida al extremo 5' del molde durante todo el proceso, de modo que ella misma supone un impedimento físico para poder llegar al final de la secuencia, promoviendo la copia reiterada de uridinas (Poon et al, 1998; Pritlove et al, 1999) hasta que

se produce una terminación prematura de la transcripción (Fig. 19).

2. REPLICACIÓN VIRAL

La replicación tiene lugar en dos pasos: a partir de las vRNPs del virión se generan las cRNPs, que son un intermediario de replicación, y a partir de estas cRNPs se generan las vRNPs que serán encapsidadas en los nuevos virones (Fig. 14). Los cRNAs y vRNAs son iniciados *de novo* y tienen un extremo trifosfato en su extremo 5' (Hay et al, 1982), siendo ATP el primer nucleótido incorporado en todos los RNAs virales. Para que tenga lugar la replicación es necesario que se hayan acumulado proteínas virales (Barrett et al, 1979), en concreto NP. Se cree que la NP aumenta la procesividad de la polimerasa durante la replicación (Honda et al, 1988) y resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación (Beaton & Krug, 1986). Durante la infección viral la cantidad de cRNA sintetizado es inferior a la cantidad de vRNA, y a tiempos tardíos de la infección la relación entre los vRNAs de los distintos segmentos no es equivalente. Gracias a esta regulación pueden expresarse proteínas tempranas (NP y NS1) y proteínas tardías (NS2, M1, M2, HA y NA) durante la infección. A diferencia de las vRNPs, las cRNPs no salen del núcleo durante la infección, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que la replicación esté asociada a la matriz nuclear (López-Turiso et al, 1990).

Recientemente se ha demostrado que una polimerasa distinta de la que replica es capaz de encapsidar los RNAs sintetizados para la generación de las RNPs progenie, y que una polimerasa en *trans* es responsable de la síntesis viral en el paso de cRNA a vRNA (Jorba et al, 2009). Con estos resultados los autores han propuesto un nuevo modelo de replicación para el virus de la gripe. Para el inicio de la replicación la polimerasa no residente en la RNP debe tener acceso al extremo 3' del cRNA (Fig. 110-2/3). Este

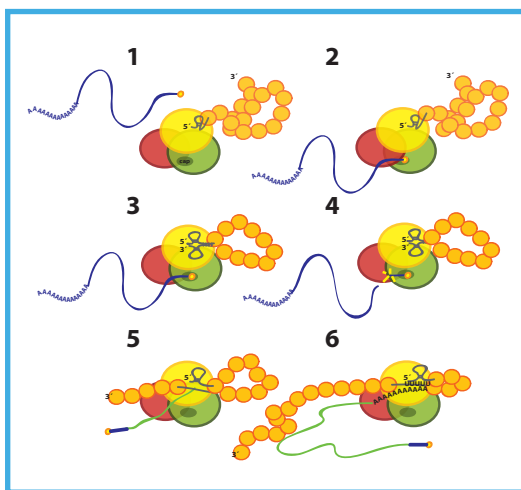


Figura 19. Diagrama del proceso de transcripción viral. (1) La polimerasa viral se une al extremo 5' del vRNA. (2) Esta interacción activa la unión de PB2 a las estructuras *cap* (en amarillo) de los mRNAs celulares (en azul). (3) La interacción del *cap* estimula la unión de la polimerasa al extremo 3' del vRNA. (4) La interacción de los dos extremos del vRNA activa la endonucleasa que corta los mRNAs celulares a 10-15 nt de la estructura *cap*. (5) Elongación de la transcripción viral. (6) Terminación de la transcripción mediante la síntesis de la cola poliA gracias a la señal de poliadenilación del vRNA (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

paso podría estar mediado por la interacción entre polimerasas descrita anteriormente (Jorba et al, 2008a). Una vez la polimerasa soluble ha entrado a formar parte de complejo cRNP empieza la síntesis del vRNA. El nuevo RNA es protegido a su vez por un complejo soluble de polimerasa distinto del que replica (Fig. 110-4/6). Una vez unido el complejo al extremo 5', el nuevo RNA ha de ser protegido por moléculas de NP. La interacción de varios complejos de polimerasa podrían formar una estructura por la que una sola molécula de cRNA-NP se moviera en dirección 3' - 5' y se replicara muy efectivamente gracias a esta disposición. Estas estructuras se han observado en otros virus como Poliovirus

(Hobson et al, 2001; Lyle et al, 2002) y HCV (Qin et al, 2002; Wang et al, 2002), y sus polimerasas actúan de modo cooperativo para la síntesis de RNA. Un paso que queda sin resolver es cómo la polimerasa puede pasar de largo por la señal de poliadenilación y realizar una copia completa del cRNA, ya que el extremo 5' del molde tiene unida la polimerasa paterna. Una opción sería que las polimerasas no residentes que sintetizan el RNA pudieran desplazar y reemplazar, de forma transitoria o permanente (Fig. 110-6), la polimerasa residente para la completa copia del molde y además proteger el extremo 5' para evitar su degradación. Tras la replicación, el RNA paterno en el primer caso volvería a estar

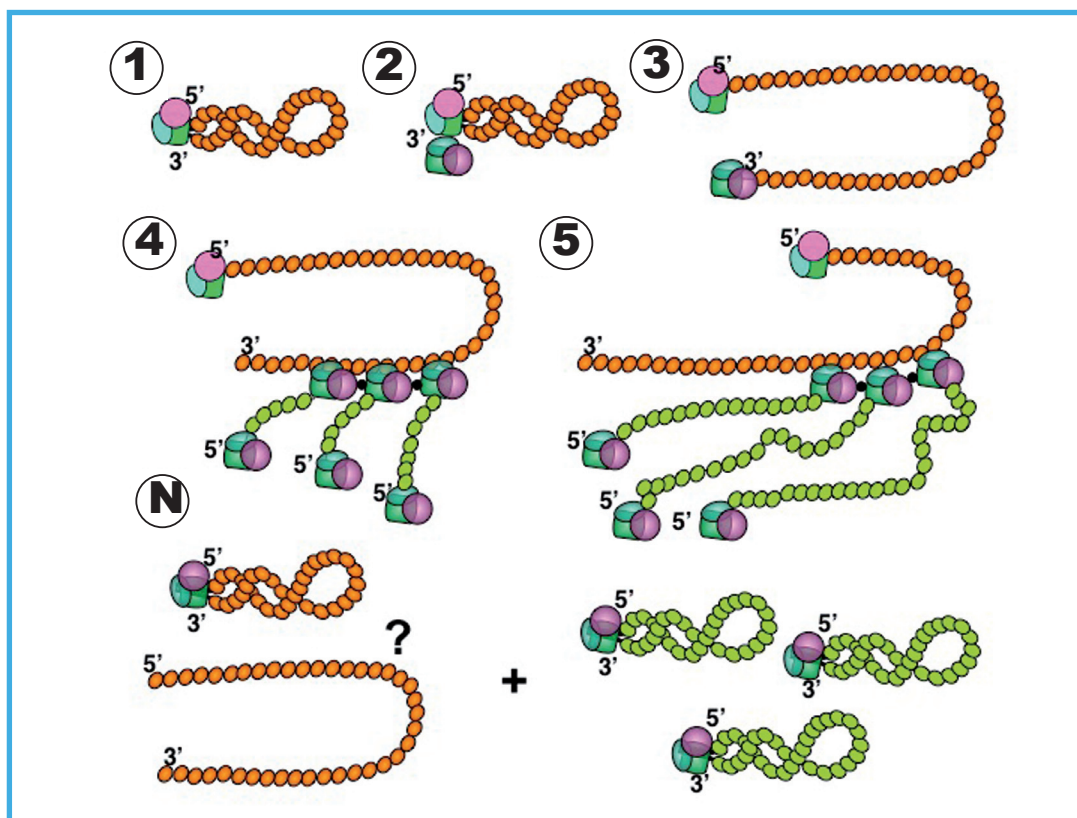


Figura 110. Diagrama de los procesos de replicación virales. Se muestran los sucesivos pasos de la replicación de las cRNPs (en naranja) para dar lugar a vRNPs progenie (verde). En negro se representa la interacción entre complejos de polimerasa. La polimerasa paterna se representa en colores sólidos mientras que la polimerasa soluble de nueva síntesis se representa en colores semitransparentes. 1) vRNP con los dos extremos del vRNA unidos a la polimerasa; 2-3) La presencia de NP y polimerasa solubles activan la replicación viral. Reconocimiento del extremo 3' por la polimerasa soluble; 4-5) Elongación de la replicación y protección del RNA por moléculas de NP. Unión del extremo 5' por otra polimerasa soluble. Plataforma de síntesis cooperativa de RNA en la que nos encontramos varias polimerasas solubles replicando al mismo tiempo; 6) Productos de la replicación viral, las cRNPs (en naranja) y vRNPs (en verde) (Jorba et al, 2009).

encapsidado por la polimerasa residente, y en el segundo quedaría linearizado (Fig. I10-4/6) (Klumpp et al, 1997). Este modelo debería ser posible también para la replicación del cRNA a partir del vRNA, pero de momento no ha podido ser demostrado. Por otro lado, Vreede et al., describieron experimentos que sugieren que parte de la replicación de vRNA a cRNA podría ocurrir *en cis* (Vreede & Brownlee, 2007; Vreede et al, 2004).

FACTORES CELULARES ASOCIADOS A LAS RNPs

Debido a la carencia de componentes para completar su ciclo vital de manera independiente, los virus son parásitos obligados de sus células huéspedes. El virus de la gripe lleva a cabo numerosos procesos dentro de la célula infectada que implican poner a su servicio la maquinaria celular. Para ello necesita establecer interacciones con factores celulares de distinta naturaleza y función. Los primeros estudios que buscaron proteínas celulares que interaccionaran con el virus de la gripe, utilizaron técnicas de doble híbrido en levaduras o coimmunoprecipitaciones (Digard et al, 1999; Engelhardt et al, 2005; Huarte et al, 2001; Momose et al, 2002; Wang et al, 1997). Últimamente se han empleado abordajes de tipo proteómico para identificar factores celulares asociados a las RNPs o a la polimerasa viral (Jorba et al, 2008b; Mayer et al, 2007). Se han descrito proteínas asociadas que intervienen en procesos variados de la transcripción celular, como la de el dominio carboxilo-terminal (CTD) hiperfosforilado de la RNAP II (Engelhardt et al, 2005). También se han descrito interacciones con proteínas relacionadas con la transcripción general, como PA con hCLE (Huarte et al, 2001), PB1 con Ebp-1 (Erb-B3 binding protein 1) (Honda et al, 2007), la RNP con PARP-1 (poly-adenyl-ribosyl-polymerase 1) y con DDB1 (DNA-damage

binding protein 1) (Mayer et al, 2007), y de la polimerasa con NXP2 y DDX5 (Jorba et al, 2008b). Algunos trabajos han mostrado interacciones de proteínas virales con proteínas de la cromatina, como PA con CHD6, proteína perteneciente a una familia de remodeladores de cromatina (Huarte et al, 2001), o las RNPs a través de NP, con el nucleosoma a través de las colas N-terminales de las histonas (García-Robles et al, 2005). También se han descrito asociaciones del virus con la maquinaria de *splicing* celular, como la interacción entre NP y UAP56 (Momose et al, 2001), y la polimerasa con SFPQ/PSF, hnRNP M y hnRNP H1 (Jorba et al, 2008b). Algunas proteínas que se ha descrito como asociadas a factores virales tienen funciones relacionadas con la importación y exportación de factores al núcleo, como la importina $\alpha 1$ (NPI-1) (O'Neill et al, 1995) y la importina $\alpha 2$ (NPI-3) (Wang et al, 1997) que interaccionan con NP y que participan en el transporte al núcleo de las RNPs, la importina $\beta 3$ (RanBP5) interacciona con PB1 (Deng et al, 2006), y la importina $\alpha 5$ y $\alpha 7$ que se asocian a PB2 (Resa-Infante et al, 2008). También se han descrito interacciones de la RNP viral con estructuras de la periferia nuclear y componentes de la vía de exportación de CRM1, como la propia CRM1, importina- α , fibras de actina, proteínas Mx (Digard et al, 1999; Elton et al, 2001; Engelhardt et al, 2004; Ma et al, 2001) y la RNA helicasa DDX3 (Jorba et al, 2008b). Otros factores que interaccionan con proteínas virales están implicados en traducción, como la proteína S3 de la subunidad 40S del ribosoma que interacciona con la polimerasa viral (Jorba et al, 2008b). Se han descrito interacciones entre proteínas virales y proteínas de la familia de las HSP (heat shock proteins), como HSP90 que interacciona con PB2 y PB1 (Momose et al, 2002), y HSP70 que se asocia a las RNPs (Hirayama et al, 2004). Varios estudios han documentado interacciones de proteínas virales con componentes del citoesqueleto celular, que podrían facilitar el transporte de proteínas y RNPs en distintos momentos del ciclo viral,

como la NP con filamentos de F-actina (Digard et al, 1999) y β -tubulina con la polimerasa viral (Jorba et al, 2008b).

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE MAQUINARIAS DE REPLICACIÓN

1. ABORDAJES TRIDIMENSIONALES

Para estudiar la estructura tridimensional que adopta una proteína se han diseñado distintos métodos, bien mediante predicción a partir de datos bioquímicos, o bien mediante la aplicación de técnicas biofísicas. Dentro de éstas últimas se encuentran la cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica de transmisión. Las dos primeras proporcionan información de alta resolución

pero las muestras bajo estudio deben reunir una serie de condiciones. La difracción de rayos X necesita macromoléculas que cristalicen, lo cual no es siempre factible. La espectrometría por resonancia magnética nuclear permite el estudio de moléculas en solución, aunque está limitada a moléculas de pequeño tamaño (< 30 kDa) y necesita de unas elevadas concentraciones, así como una alta solubilidad de la proteína en estudio. Por otra parte, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) de partículas individuales permite determinar la estructura tridimensional de grandes moléculas biológicas a media resolución. Con esta técnica se han caracterizado estructuralmente moléculas o complejos de alto peso molecular que no pueden ser analizados por otras técnicas biofísicas debido, entre otras razones, a las dificultades para abordar su purificación y a las altas concentraciones y purezas requeridas.

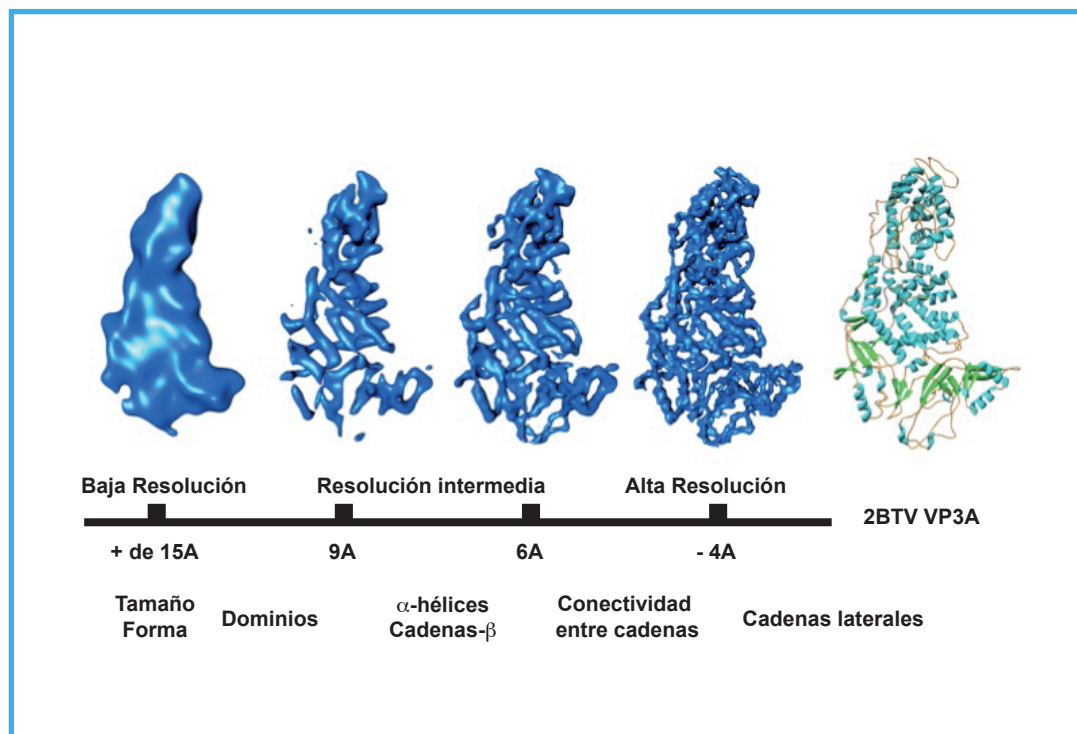


Figura I11. Esquema de la información estructural obtenida en función de la resolución. De izquierda a derecha, se muestran ejemplos de estructura de la proteína Vp3A de menor a mayor resolución. En la barra inferior se indica la resolución de cada uno de los modelos, así como los elementos de estructura secundaria y terciaria que se pueden identificar en cada caso (Grimes et al, 1998).

Se ha empleado también para determinar la estructura de distintas conformaciones de macrocomplejos, como el ribosoma (Stark et al, 2002; Valle et al, 2003), y para obtener la estructura de proteínas que presentan cierta flexibilidad. La resolución alcanzada es inferior a la obtenida por técnicas cristalográficas o de resonancia magnética nuclear. Esto se debe a tanto a factores técnicos y problemas inherentes a la formación de imágenes en el microscopio electrónico, como al daño sufrido por la muestra al ser irradiada (Fig. I11).

2. REQUERIMIENTOS EN MICROSCOPIA

Existen dos abordajes experimentales principales dentro de la microscopía electrónica de moléculas: tinción negativa y criomicroscopía (Thuman-Commike, 2001). En ambos casos la muestra se coloca sobre una rejilla cubierta por una fina capa de carbón, en el caso de criomicroscopía esta está perforada, que ha sido sometida a una descarga iónica para hacerla hidrofílica, para facilitar la adhesión de las moléculas al soporte. En los estudios por tinción negativa la muestra se incuba, previamente a su observación al microscopio, con una solución de un agente de tinción. El agente de tinción incrementa el contraste de la molécula, facilitándose su observación con el microscopio, y protege parcialmente a la muestra del daño por irradiación. En los análisis por criomicroscopía la rejilla se congela en etano líquido para mantener las moléculas embebidas en una capa de hielo vítreo, preservándose de este modo su conformación nativa. Una tercera variante intermedia entre las dos anteriores es la criotinción negativa. En este caso la muestra se prepara sobre la rejilla incluida en un colorante electrodenso y se congela en etano. Las moléculas pequeñas ($PM \leq 150$ kDa) solamente pueden estudiarse en presencia de un agente de tinción que incremente su contraste, por lo que no es posible su análisis mediante técnicas de criomicroscopía.

Para el estudio por técnicas de microscopía electrónica, la muestra ha de presentar una pureza elevada, ya que se asume que todas las partículas observadas corresponden a la misma molécula. Además, ésta debe presentar un estado conformacional único, o en su defecto, las diferentes conformaciones deben ser suficientemente divergentes para permitir su separación por métodos estadísticos. En el caso de tinción negativa, la concentración adecuada de muestra suele estar en el rango de 10-100 $\mu\text{g/ml}$, aunque puede variar en función de las características de la molécula. Para los estudios de criomicroscopía se requiere una mayor concentración de proteína.

3. DE LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO A LA OBTENCIÓN DE UN MODELO 3D

EL PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN. ANÁLISIS BIDIMENSIONAL

Para llegar a determinar la estructura tridimensional de una molécula es necesario obtener una serie de datos de las distintas imágenes tomadas al microscopio electrónico, para lo cual serán procesadas siguiendo distintos pasos (Fig. I12).

a) Toma de datos con dosis electrónica mínima: La observación de partículas al microscopio electrónico supone una irradiación de la muestra con el consiguiente daño en la estructura. Para evitar este problema se emplea la técnica de “mínima dosis electrónica”, que consiste en seleccionar un área de la muestra al microscopio para el correcto enfoque y desplazar el haz electrónico hacia el área adyacente sólo en el momento de tomar la micrografía. De esta manera, se consiguen exposiciones de menos de $10 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ que causan un daño mínimo a la molécula (Czarnota et al, 1994).

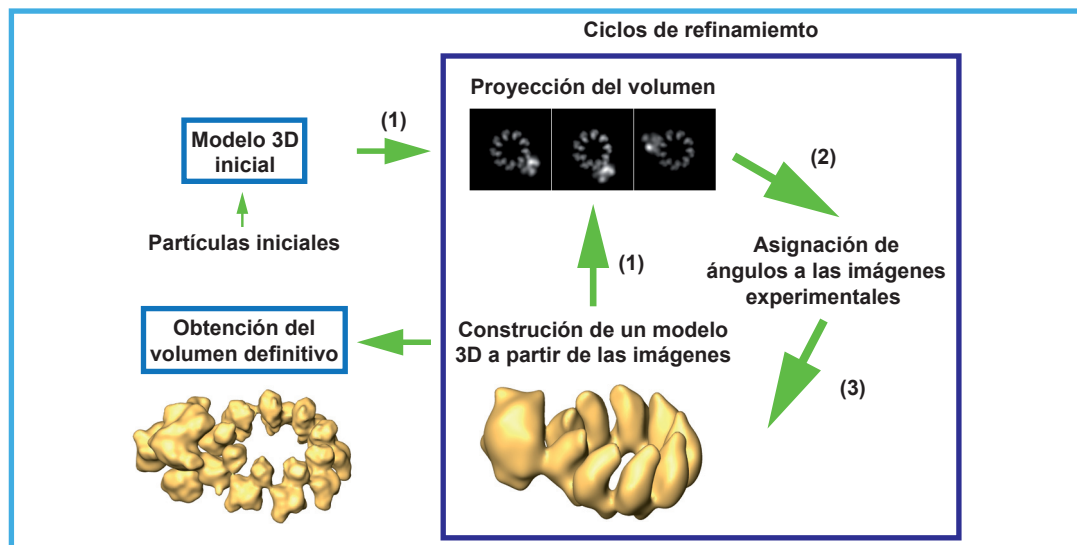


Figura I12. Esquema de un ciclo de refinado. Se resumen los pasos que se han de ejecutar para obtener un volumen final convergente desde un modelo 3D inicial tomando como ejemplo la proteína DNA-PKcs (Rivera-Calzada et al, 2005). 1) Proyección del volumen de referencia; 2) Asignación de ángulos a las imágenes experimentales; 3) Reconstrucción de un volumen mejorado a partir de las imágenes.

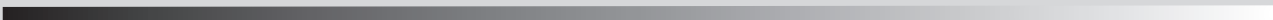
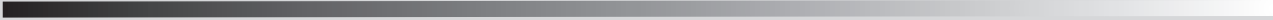
b) Digitalización: Para llevar a cabo el procesamiento de las imágenes es necesario transformar la señal analógica de una micrografía en una señal digital que pueda transferirse a un ordenador. Este proceso consiste en el muestreo de la micrografía mediante un escáner o digitalizador de alta precisión que mide el nivel de gris de cada punto del negativo o *píxel* (Dunn & Maxfield, 1998).

c) Procesamiento bidimensional: Este proceso se basa en el alineamiento de las imágenes obtenidas al microscopio electrónico y el cálculo de un promedio de todas ellas. Pese a que muchas de las técnicas de reconstrucción tridimensional no utilizan imágenes promediadas, este método es muy útil como paso previo para conseguir evaluar la calidad del conjunto de datos obtenidos y su heterogeneidad, así como la resolución potencial de la futura reconstrucción tridimensional. Este alineamiento se realiza mediante una serie de rotaciones y traslaciones de las imágenes hasta llegar a obtener la mejor superposición y finalmente el promedio de todas ellas (Frank et al, 1996).

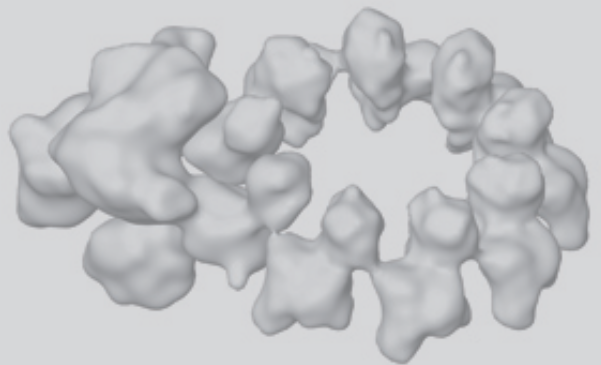
d) Clasificación de las partículas: La correcta superposición y promediado de las imágenes depende de que éstas sean homogéneas y tengan una buena relación señal/ruido. Para solucionar el problema de la heterogeneidad en las partículas se han desarrollado diferentes métodos que permiten la clasificación del conjunto de las imágenes en clases homogéneas definidas. Este paso es imprescindible sobre todo en los casos en los que no se tiene ninguna información estructural previa (Pascual et al, 2000; Pascual-Montano et al, 2001). Estos métodos de clasificación son algoritmos basados en la comparación de cada una de las imágenes con el resto de la colección. Determinan las diferencias más importantes entre ellas y usan estas diferencias como criterio de separación entre clases de partículas (Kohonen, 1990; Pascual-Montano et al, 2001; Pascual-Montano et al, 2002). Este método puede ser utilizado para eliminar las imágenes de mala calidad, permitiendo así un promedio mucho más definido. Además, la clasificación puede repetirse sucesivamente para afinar la selección de las imágenes o añadir nuevos parámetros más restrictivos durante la clasificación.

RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE PARTÍCULAS INDIVIDUALES

Fundamentalmente, este proceso se basa en calcular una estructura tridimensional a partir de imágenes bidimensionales que son tratadas como proyecciones de la misma (Frank et al, 1996; Thuman-Commike, 2001) (Fig. I12). Los algoritmos diseñados para llevar a cabo cada uno de los pasos necesarios para la reconstrucción funcionan tomando un modelo como punto de partida, el cual será proyectado en todas las direcciones del espacio según los ángulos de *Euler* (Frank et al, 1996). El programa recoge los datos de todas las proyecciones generadas y las compara una a una con las imágenes experimentales tomadas del microscopio electrónico. De esta manera, a cada imagen se le asignan tres ángulos que la definen como una posible proyección del volumen. Una vez que todas las imágenes están definidas como proyecciones, el programa reconstruye un nuevo volumen a partir de las mismas, que resultará más definido que el modelo inicial. Este proceso se denomina *refinamiento* y será repetido iterativamente, obteniendo volúmenes mejorados cada vez hasta un punto óptimo. Este proceso iterativo converge hacia una estructura final cuando en el paso de asignación de ángulos a las imágenes experimentales (Fig. I12-2) no se producen apenas variaciones entre una iteración y la siguiente.



OBJETIVOS



Al comienzo de esta Tesis se había descrito la estructura tridimensional de una RNP recombinante del virus de la gripe, obtenida mediante microscopía electrónica de tinción negativa y procesamiento de imágenes. Sin embargo la baja resolución de esta estructura no permitió formular predicciones biológicas relevantes. También se habían descrito las estructuras atómicas de RNPs de otros virus con RNA de banda negativa, pero ninguna de ellas reflejaba la estructura activa puesto que no incluían la polimerasa.

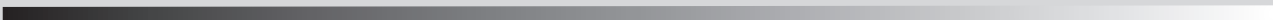
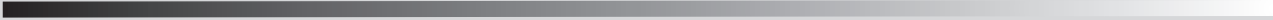
Con estos antecedentes el Objetivo general de esta Tesis fue la obtención de la estructura tridimensional de la RNP funcionalmente activa del virus de la gripe a la máxima resolución posible. En este contexto, nos propusimos los siguientes Objetivos concretos:

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RNP:

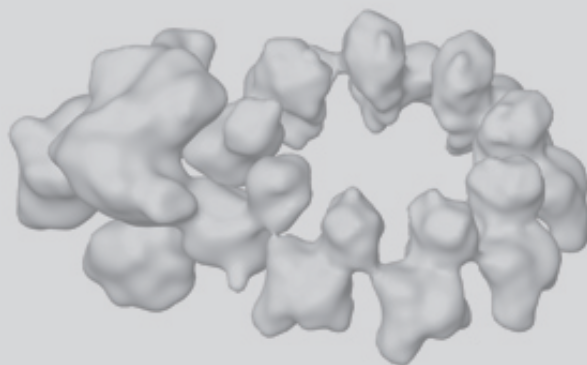
- 1.** Generación y purificación de mini-RNPs recombinantes .
- 2.** Obtención de la estructura tridimensional de la mini-RNP mediante criomicroscopía electrónica.
- 3.** Análisis de la estructura de la RNP del virus de la gripe. Interacción NP-NP. Interacción NP-polimerasa. Localización del RNA.

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RNP:

- 4.** Estudio del proceso de transcripción llevada a cabo por la RNP.



MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES BIOLÓGICOS

LÍNEAS CELULARES

La línea celular COS-1 fue cedida por Y. Gluzman (Gluzman, 1981) y la línea HEK-293T fue cedida por T. Zürcher (Graham et al, 1977).

BACTERIAS

La cepa bacteriana utilizada para la amplificación de todos los plásmidos fue *E. coli* DH5 α .

VIRUS

El virus *Vaccinia* recombinante vTF7-3, que expresa la RNA polimerasa del fago T7 (Fuerst et al, 1987) fue cedido por B. Moss.

PLÁSMIDOS

Los plásmidos pGPB1, pGPB2, pGPA y pGNP, que contienen los cDNAs de las subunidades de la polimerasa viral y la nucleoproteína bajo el promotor de la polimerasa del fago T7, han sido descritos previamente (Mena et al, 1994). El plásmido pGPB2-HIS fue cedido por E. Area (Area et al, 2004). El plásmido pT7 Δ NSRT clon 23, que genera una copia de vRNA de 248 nucleótidos y el plásmido pT7 Δ NSCAT y pT7NSCAT RT que posee la secuencia de la proteína CAT en polaridad negativa, ambos bajo el promotor de T7, han sido descritos anteriormente y fueron cedidos por J. Ortega (Ortega et al, 2000), así como los plásmidos pCMVPB1, pCMVPB2, pCMVPA y pCMVNP, que codifican las subunidades de la polimerasa y NP bajo el promotor de Citomegalovirus (Falcón et al, 2004). El plásmido pHH21 fue cedido G. Hobom (Neumann et al,

1999). El plásmido pHHCAT fue clonado y cedido por A. Rodríguez. El mutante de pCMVPB2-HIS E361A ha sido previamente descrito (Guilligay et al, 2008). Los mutantes pCMVPB2 E361A, pCMVPB2-HIS R142A y pCMVPB2 R142A fueron contruidos y cedidos por N. Jorba.

ANTICUERPOS

Los sueros contra la subunidad PB1 y contra la NP fueron generados en el laboratorio por N. Zamarreño. Los anticuerpos monoclonales específicos para las subunidades de la polimerasa PB2 (8 y 28) y PA (2 y 9), han sido descritos previamente (Bárcena et al, 1994; Ochoa et al, 1995).

RESINAS DE CROMATOGRAFÍA

La resina de Ni²⁺-NTA-agarosa fue adquirida a *Invitrogen*.

La resinas Sephacryl S-300 HR y S-400 HR fueron adquiridas a *Sigma*.

MÉTODOS

MANIPULACIÓN DEL DNA Y CLONAJES

1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PCMV PB2-HIS

El plásmido pCMVPB2-HIS se generó mediante un cambio de cassette del pGPB2-HIS al pCMV-KB. Se digirió el plásmido pCMV-KB con la enzima de restricción Not I, que genera extremos cohesivos, y el pGPB2-HIS con la enzima Pme I, que genera extremos romos. Los extremos cohesivos del pCMV-KB se rellenaron con Klenow. Ambos plásmidos se digirieron con Xma I.

2. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PHH CLON 23

Para la construcción del plásmido pHH21ΔNSRT clon 23 se realizó una PCR sobre el plásmido pT7ΔNSRT clon 23 con la enzima Taq Polimerasa y con los cebadores de gripe que contenían la diana de restricción para BsmB I (Tabla 1). Tanto el fragmento de PCR como el vector pHH21 fueron digeridos con BsmB I y los productos de la digestión se ligaron para formar el plásmido buscado. En todos los casos, las construcciones fueron comprobadas por análisis de restricción y

secuenciación con oligonucleótidos específicos. La restricción, aislamiento y ligación de DNA así como la transformación de *E. coli* DH5α se realizaron según las condiciones estándar (Sambrook, 1989).

3. MUTANTES DE NP

Los mutantes de NP fueron generados por PCR mutagénica sobre el plásmido pGNP (poly A), usando el kit comercial *Quickchange* de *Stratagene* y oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Las mutaciones se comprobaron por secuenciación con oligonucleótidos específicos.

Oligo	Secuencia
bsmb5v	GTCACGTCTCATATTAGTAGAAACAAGG
bsmb3v	CTGACGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGG
F412Ad	TCAGTGTGCAACCTGCAGCTTCTGTGCAAAGAAACC
F412Ar	GGTTTCTTTGCACAGAAGCTGCAGGTTGCACACTGA
S413Td	GTGTGCAACCTGCATTTACTGTGCAAAGAAACCTC
S413Ar	GAGGTTTCTTTGCACAGTAAATGCAGGTTGCACAC
R416Ad	GCAACCTGCATTTTCTGTGCAAGCAAACCTCCCATTTGACAAATC
R416Ar	GATTTGTCAAATGGGAGGTTTGCTTGACAGAAAATGCAGGTTGC
F420Ad	GTGCAAAGAAACCTCCAGCTGACAAATCAACCATCATGG
F420Ar	CCATGATGGTTGATTTGTGAGCTGGGAGGTTTCTTTGCAC
K422Ad	GAAACCTCCCATTTGACGCATCAACCATCATGGCAGC
K422Ar	GCTGCCATGATGGTTGATGCGTCAAATGGGAGGTTTC
S423Td	CCTCCCATTTGACAAAACAACCATCATGGCAGC
S423Tr	GCTGCCATGATGGTTGTTTGTCAAATGGGAGG
Y97Ad	AACTGGAGGGCCCATAGCCAAGAGAGTAGATGGAA
Y97Ar	TTCCATCTACTCTTGGCTATGGGCCCTCCAGTT
R98Ad	TGGAGGGCCCATATACGCGAGAGTAGATGGAAAGT
R98Ar	ACTTTCATCTACTCTCGCTATATGGGCCCTCCA
D101Ad	CATATACAAGAGAGTAGCTGGAAAGTGGATGAGGG
D101Ar	CCCTCATCCACTTTCAGCTACTCTTTGTATATG
W104Ad	AGAGAGTAGATGGAAAGGCGATGAGGGAACCTGTC
W104Ar	GGACGAGTTCCTCATCGCCTTTCATCTACTCTCT
E369Ad	GGAGTACAAATTGCTTCAAATGCAAACATGGATACTATGGAATC
E369Ar	GATTCCATAGTATCCATGTTTGCAATTGAAGCAATTTGACTCC
T373Gd	GCTTCAAATGAAAACATGGATGGTATGGAATCAAGTACTCTTGA
T373Ar	TCAAGAGTACTTGATTCCATACCATCCATGTTTTCATTGAAGC

Tabla MyM1: Secuencias de los oligos utilizados en los clonajes y las mutagénesis.

GENERACIÓN Y TITULACIÓN DE VTF7-3

1. GENERACIÓN DE STOCKS DE VIRUS

Se infectaron cultivos confluentes de células BSC-40 con el virus vTF7-3, a una multiplicidad de 10^{-2} unidades formadoras de placa (UFP) por célula, preparado en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM). Tras una hora a 37°C durante la cual tiene lugar la adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio nuevo suplementado con 2% Newborn Calf Serum (NCS). El sobrenadante se recogió tras 72 horas a 37°C, se centrifugó a 2500 rpm 5 minutos a 4°C y se congeló a -80°C.

2. TITULACIÓN DE VIRUS MEDIANTE ENSAYO EN PLACA

Se infectaron monocapas de células confluentes BSC-40 con diluciones decimales seriadas de virus preparadas en DMEM, durante

1 hora a 37°C. Se retiró el inóculo y los cultivos se incubaron durante 72 horas en un medio semisólido que contenía DMEM, 0,7% agar, 1% DEAE-dextrano y 2% NCS. Las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta y se hizo un recuento de las placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO} = (\text{Nº de placas} * 1/\text{Factor de dilución}) * (1/\text{Volumen del inóculo vírico (ml)})$$

MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

1. RECONSTITUCIÓN DE RNPs IN VIVO

1.1 PARA ANÁLISIS ESTRUCTURAL

Las células COS-1 se cultivaron en DMEM enriquecido con un 5% de suero fetal bovino (FBS) y aminoácidos no esenciales, siguiendo el protocolo descrito (Ortín et al, 1980). Para llevar a cabo la reconstitución de las RNPs, se infectaron cultivos de 30×10^6 células en placas de 150 mm con el virus vTF7-3 a una multiplicidad de 10 UFP por célula. Tras una hora a 37°C durante la cual tiene lugar la adsorción del virus, las células se transfectaron con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa, la nucleoproteína y el vRNA modelo (Fig. MyM1) (9 µg de pGPB1, 9 µg de pGPB2, 1,8 µg de pGPA, 36 µg de pGNP y 36 µg de pT7ΔNSRT clon 23) y una mezcla de liposomas catiónicos (Rose et al, 1991), siguiendo el protocolo descrito (Martín-Benito et al, 2001).

1.2 PARA ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA

Las células 293T se cultivaron en medio DMEM enriquecido con un 10% de FBS, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células 293T se llevaron a cabo utilizando el

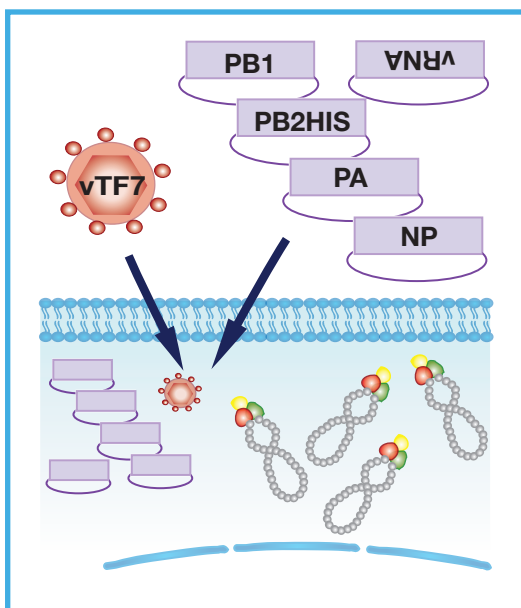


Figura MyM1. Reconstitución de RNPs para microscopía. Cultivos de células COS1 se infectaron con el virus vTF7-3, tras 1 hora a 37°C se transfectaron con los plásmidos pGPA, pGPB1, pGPB2-HIS, pGNP y pT7ΔNSRT clon 23, con una mezcla de liposomas catiónicos (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

método del fosfato cálcico (Wigler et al, 1979). Se cambió el medio, añadiendo medio DMEM enriquecido con 10% de FBS y 4 horas después se transfectoron las siguientes cantidades de plásmidos por 10^6 células: pCMVPB1 (3 μ g), pCMVPB2 (3 μ g), pCMVPA (0.6 μ g), pCMVNP (12 μ g), y pHH21 Δ NSRT clon 23 o pHHCAT (1.8 μ g) (Fig. MyM2). En los casos necesarios, el plásmido que genera las copias silvestres de la subunidad PB2 fue sustituido en la mezcla de transfección por los mutantes pCMVPB2-HIS E361A o pCMVPB2-HIS R142A. Los cultivos celulares se incubaron 20 horas a 37°C.

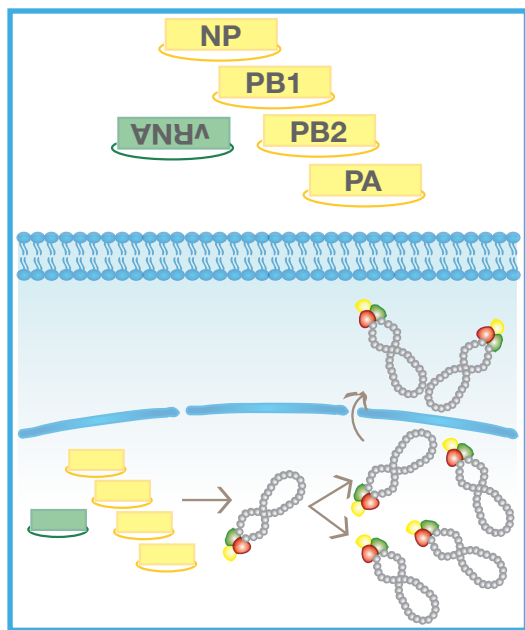


Figura MyM2. Reconstitución de RNPs para los ensayos de complementación genética. Cultivos subconfluentes de células HEK293T se transfectoron con los plásmidos pCMVPA, pCMVPB1, pCMVPB2-HIS, pCMVNP y pHH21 Δ NSRT clon 23 clon 23, siguiendo el procedimiento del fosfato cálcico (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

2. RECONSTITUCIÓN DE POLIMERASA IN VIVO

Se transfectoron células 293T utilizando el método del fosfato cálcico anteriormente descrito. Se transfectoron, pCMVPB1 (0.5 μ g),

pCMVPB2 (0.5 μ g) y pCMVPA (0.1 μ g) por 10^7 células. En los casos necesarios, el plásmido PB2 fue sustituido en la mezcla de transfección por los mutantes pCMVPB2 E361A o pCMVPB2 R142A y los cultivos se incubaron 20 horas a 37°C.

3. EXPRESIÓN DE NUCLEOPROTEÍNA

Se infectaron cultivos de 10^6 células COS-1 con el virus vTF7-3 como se ha descrito anteriormente. Se transfectoron 2 μ g de pGNP o de los respectivos mutantes con la mezcla de liposomas catiónicos y los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C.

4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

Las células se recogieron en PBS frío, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm y el precipitado se resuspendió en buffer AT (7.5 mM sulfato amónico, 1 mM EDTA, 0.025% IGEPAL, 10 mM Tris. Hcl pH 8, 1u/ μ l de HPRI (*Human Placental Ribonuclease Inhibitor*, de Amersham) e inhibidores de proteasas (*Inhibitor Cocktail Complete*, de Roche)). Después de dos horas de incubación a 0°C, durante las cuales la mezcla se agitó con vortex cada 15-20 minutos, se centrifugó 20 minutos a 12000 rpm y se recogió el sobrenadante (Ortega et al, 2000).

PURIFICACIÓN DE RNPs

PASO1. PURIFICACIÓN DE RNPs POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Los extractos citoplasmáticos se diluyeron en el tampón de unión a níquel (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM MgCl₂, 0.5% IGEPAL, 20 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas). Seguidamente, se incubaron con la resina de Ni²⁺-NTA-agarosa durante 12-14 horas a 4°C en la noria. La resina

se lavó 8 veces con 10 volúmenes del mismo tampón y 2 veces con 10 volúmenes de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% IGEPAL, 50 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas). Tras el lavado, el material unido a la resina se eluyó con 4 lavados de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% IGEPAL, 150 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas) (Fig. MyM3A). El material obtenido se analizó por Western Blot y transcripción *in vitro*.

PASO2. PURIFICACIÓN DE RNPs POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

La elución con mayor concentración, procedente de la cromatografía de afinidad, se

pasó por una columna de filtración molecular Sephacryl S-400 (Sigma) de 3 ml (Fig. MyM3B), equilibrada en tampón de unión a níquel (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% IGEPAL, 20 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas), se recogieron las fracciones y se analizaron por Western Blot, tinción de plata y transcripción *in vitro*.

PASO 3. CONCENTRACIÓN DE RNPs POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Para el análisis estructural era importante obtener la máxima concentración en la muestra. Para ello, las fracciones del pico de la columna que contenían más RNPs se diluyeron en tampón de unión a níquel (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% IGEPAL, 20 mM Imidazol,

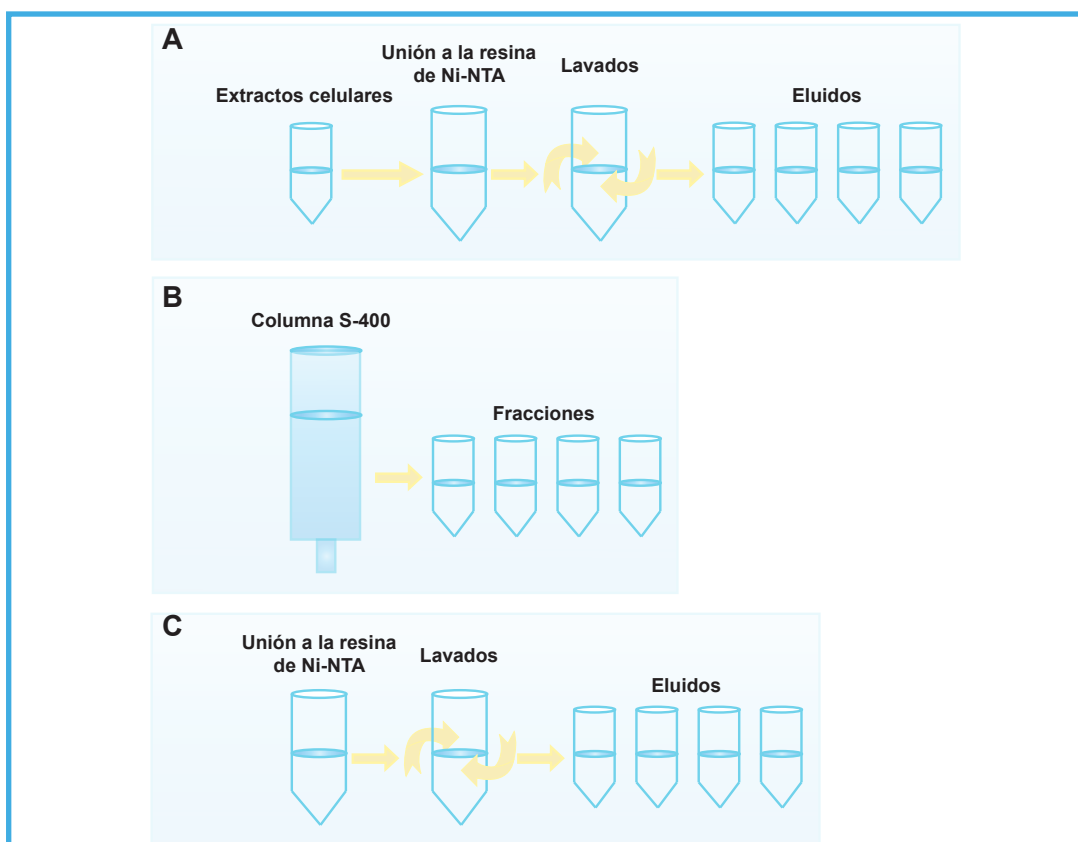


Figura MyM3. Esquema de la purificación de las RNPs. A) Cromatografía de afinidad, B) Cromatografía de exclusión molecular y C) Concentración por cromatografía de afinidad.

10 mM β -Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas). Seguidamente, se incubaron con la resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa durante 1 hora a 4°C en la noria y se eluyeron en tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM ClK, 5 mM MgCl_2 , 0.3% CHAPS, 200 mM Imidazol, 10 mM β -Mercaptoetanol e inhibidores de proteasas) (Fig. MyM3C). El material obtenido se analizó por Western Blot y tinción de plata y se utilizó para análisis posteriores.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1. WESTERN BLOT

Las distintas muestras fueron fraccionadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (30:1) 0.1% SDS y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Inmobilon) durante 1 hora a 400 mA y a 4 °C. Los filtros fueron saturados con 3% seroalbúmina bovina (SAB) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-PA (dilución 1/40) o anti-PB2 (dilución 1/500), o bien antisueros anti-PB1 (dilución 1/1000) o anti-NP (dilución 1/5000). Tras lavar las membranas en PBS-0.25% Tween 20, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una dilución 1/15000 de suero de cabra anti-IgG de conejo o una dilución 1/3000 de suero de cabra anti-IgG de ratón, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo primario, conjugados con peroxidasa. Finalmente, las membranas se lavaron a temperatura ambiente con tampón de lavado y se revelaron por quimioluminiscencia.

2. TINCIÓN DE GELES Y MEMBRANAS

La pureza de las distintas muestras se determinó por tinción de plata o con PageBlue (Fermentas). Para la tinción con plata los geles se fijaron con 25% etanol y 10% de ácido acético durante 1 hora y posteriormente con 1% ácido nítrico durante 3 minutos. Los geles se lavaron

con agua mili-Q y se les añadió la solución sensibilizante (etanol 30%, 5% w/v tiosulfato sódico pentahidratado y 6,8% w/v acetato sódico). Después de lavar con agua, se incubaron con la solución de reacción (0,25% de nitrato de plata) durante 40 minutos. Se lavó con agua 2 veces, un minuto cada vez, y se revelaron con 2,96% carbonato sódico y formaldehído al 37%. Una vez revelados se paró la reacción con 10% ácido acético. En el caso de tinción con PageBlue, los geles se fijaron con 25% isopropanol y 10% de ácido acético durante 1 hora y se incubaron con el colorante. Para ver las bandas se lavaron los geles con agua. Las membranas se tiñeron directamente con el colorante durante 2 minutos y se destiñeron con etanol al 30%.

3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CAT

Para determinar la concentración de la proteína se utilizó el *kit* comercial de Roche.

4. PURIFICACIÓN DE OLIGÓMEROS DE NUCLEOPROTEÍNA POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Los extractos celulares, tratados o no con RNAsa (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a temperatura ambiente, se pasaron por una columna de filtración molecular Sephacryl S-300 (Sigma) de 2 ml equilibrada en tampón de filtración (20mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% IGEPAL, inhibidores de proteasas). Se recogieron las fracciones de la columna y se analizaron por Western Blot.

MANIPULACIÓN DEL RNA

1. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DE LAS RNPS

El ensayo de transcripción *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo anteriormente descrito (Perales et al, 1996). El proceso consistió en incubar las cantidades apropiadas

de RNPs en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 1mM DTT, Actinomicina D 10 $\mu\text{g/ml}$, 1U/ μl HPRI, 1mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 10 μM GTP y 10 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP (400 Ci/mmol). Como iniciador de la transcripción se utilizó 100 μM ApG (Sigma). La incubación se realizó durante una hora a 30°C, después se precipitó el producto de la reacción con TCA 10% durante 30 minutos a 0°C. Por último, el precipitado se filtró a vacío sobre una membrana de nylon con un aparato de dot blot. Tras sucesivos lavados de la membrana con TCA 5%-pirofosfato 1%, se expuso utilizando una pantalla sensible a ^{32}P (Molecular Dynamics).

2. DIGESTIÓN CONTROLADA DEL RNA

Las RNPs purificadas por cromatografía de afinidad se trataron con RNasa para eliminar el RNA que no estuviera protegido por la nucleoproteína. Para ello, tras la unión a la resina y los lavados, se diluyó la resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa en un tampón que contenía RNasa A (1.2mg/1.2x10⁸ células), RNasa T1 (30000 Uds./1.2x10⁸ células), 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl_2 , 100mM KCl, 100 μM DTT e inhibidores de proteasas. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en la noria y se lavó siguiendo el protocolo de la purificación de RNPs por cromatografía de afinidad anteriormente descrito.

3. MARCAJE DEL RNA

El RNA de la RNP y el RNA asociado a los complejos de nucleoproteína se aisló con un tratamiento de proteinasa K (0.1 mg/ml) y SDS 1% durante 1 hora a 37°C. Tras una extracción con fenol, el RNA se precipitó con etanol. Los RNAs aislados se incubaron 30 minutos a 37°C con la fosfatasa alcalina de gamba (SAP, de USB) en el tampón comercial suplementado con 5mM DTT y 1U/ μl HPRI. Tras extraer el RNA de nuevo con fenol y precipitarlo con etanol, se marcó el extremo 5'OH con la polinucleótido kinasa

T4 (T4PNK de New England BioLab) durante 30 minutos a 37°C en un tampón que contenía el tampón comercial suplementado con 1mM DTT, 1U/ μl HPRI y 20 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (400 Ci/mmol). Los RNAs marcados radiactivamente se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida-urea desnaturalizante como se ha descrito previamente (Perales et al, 1996).

MICROSCOPIA

1. TINCIÓN NEGATIVA

Los análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizaron con alícuotas de 4 a 8 μl de RNPs purificadas. Para ello la muestra se aplicó sobre rejillas de cobre-colodión cubiertas de una película de carbón, a las que se les había realizado un tratamiento de ionización (*glow discharge*) para hacer hidrofílica su superficie. Tras un periodo de adsorción de 2 minutos a temperatura ambiente se eliminó el exceso de muestra y se tiñó con acetato de uranilo al 2% p/v (Martín-Benito et al, 2001). Las muestras se visualizaron mediante MET utilizando un microscopio Philips Tecnaic G² estabilizado a 200Kv. Las micrografías se tomaron en condiciones de mínima dosis electrónica (10 e⁻/Å²), a una magnificación de 50K y con una inclinación de 20°. El procesamiento se llevó a cabo utilizando el programa de SPIDER (Frank et al, 1996). Como modelo inicial se utilizó la estructura previamente publicada (Martín-Benito et al, 2001), escalada y filtrada a 35 Å. De este modo se generó un nuevo mapa que sería empleado posteriormente para el refinamiento de los datos de criomicroscopía electrónica (Crio-ME).

2. CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para el análisis de las RNPs por Crio-ME muestras de 4 μl se incubaron durante 1 minuto en rejillas de cobre/rodio o cobre/paladio recubiertas con una película de carbón microperforado

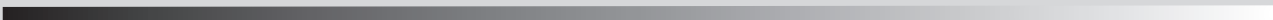
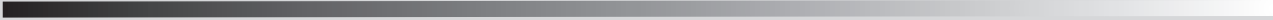
(Quantifoil) y a las que previamente se le había sometido a una descarga iónica. Tras esta incubación se eliminó el exceso de muestra con papel Wattman nº 4 y se sumergió la rejilla en etano líquido (-178°C) usando una crioestación Leica EM CPC. Esta congelación ultrarrápida consigue que la RNP quede incluida en la capa de hielo vítreo conservando su estado nativo. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones que en los análisis de tinción negativa, pero sin inclinación.

3. DIGITALIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

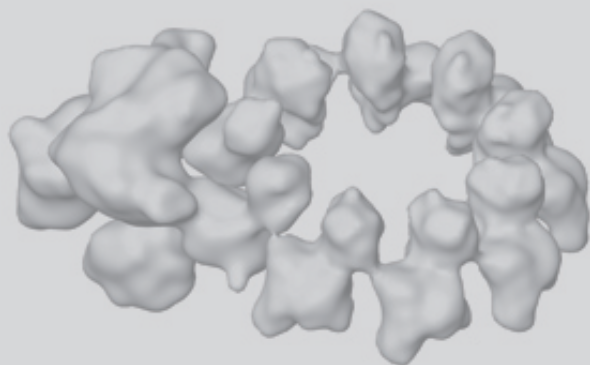
Las micrografías tomadas se digitalizaron en un escáner Photoscan TD (Zeiss), con un tamaño de ventana de 7 μm y luego fueron promediadas a la mitad para obtener un muestreo final de 2.8 Å/píxel. La función de transferencia de contraste (CTF) de las micrografías se estimó con el programa *ctffind* (Mindell & Grigorieff, 2003) y se corrigió mediante el programa *Bsoft* (Heymann, 2001), mediante un revertimiento de las fases a sus valores reales pero sin modificación de las amplitudes de los componentes de Fourier. Se extrajeron un total de 9.571 imágenes mediante herramientas del paquete de programas XMIPP (Sorzano et al, 2004) y se analizaron llevando a cabo 2 procesamientos independientes, con y sin imposición de simetría 9, utilizando el programa SPIDER (Frank et al, 1996).

4. DOCKING

El ajuste de las estructuras atómicas (*docking*) en el volumen de la NP y la polimerasa se realizó de forma manual empleando Chimera (Pettersen et al, 2004) y Amira (<http://amira.zib.de>) y se refinó usando los algoritmos de ajuste volumétrico o de superficie implementados en el programa CoLoRes/SITUS (Chacon & Wriggers, 2002).



RESULTADOS



DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE UNA RNP RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA GRIPE

En los últimos años se han publicado las estructuras atómicas de los complejos RNA-NP de diferentes virus (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006). Sin embargo, el RNA presente en estos complejos proviene de la célula en la que se ha expresado la NP, no es un RNA viral, además estos complejos han sido cristalizados sin la polimerasa viral, por lo que no son biológicamente activos y pueden no tener las mismas propiedades bioquímicas que las RNPs nativas. Las RNPs del virus de la gripe son macrocomplejos extremadamente flexibles que de momento, sólo pueden ser estudiados por microscopía electrónica. Nuestro laboratorio fue el primero y por ahora el único, que ha sido capaz de obtener la estructura de una RNP biológicamente activa (Martín-Benito et al, 2001). De hecho, la estructura corresponde una mini-RNP recombinante de 9 monómeros, ya que las RNPs presentes en el virión son excesivamente flexibles incluso para ser estudiadas por microscopía, mediante técnicas de procesamiento de imágenes de partículas individuales.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral era obtener la estructura de la RNP del virus de la gripe a la mayor resolución posible. Para ello se utilizó la criomicroscopía electrónica (Crio-ME). Este tipo de microscopía permite alcanzar mayor resolución ya que las imágenes obtenidas son una proyección del potencial de los átomos que forman la propia molécula. No obstante, requiere unas condiciones adecuadas de concentración y pureza.

1. GENERACIÓN DE RNPs RECOMBINANTES

1.1 RECONSTITUCIÓN DE RNPs

Al comienzo de esta Tesis se tenía puesto a punto un sistema de generación y purificación que permitió obtener la primera estructura de una RNP biológicamente activa, mediante microscopía electrónica de transmisión (ME) y tinción negativa. Sin embargo, el rendimiento de este sistema no era suficiente para abordar su estudio por Crio-EM. Para resolver este problema se probaron diferentes líneas celulares y sistemas de transfección, así como diferentes métodos y tampones de purificación, hasta lograr un sistema que permitiera obtener RNPs con la concentración y la pureza adecuadas de forma rutinaria.

1.1.1 LÍNEAS CELULARES, PLÁSMIDOS Y REACTIVOS DE TRANSFECCIÓN

Antes de esta Tesis, las RNPs recombinantes se reconstituían infectando células COS 1 con el virus *Vaccinia* recombinante vTF7-3 y transfectando después los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa, el RNA molde clon 23 y la NP bajo el promotor de T7 (pGEM PB1, pGEM PB2HIS, pGEM PA, pGEM NP y pT7ΔNSRT clon 23), utilizando liposomas catiónicos como sistema de transfección (Martín-Benito et al, 2001; Ortega et al, 2000).

Con el objetivo de aumentar la concentración se reconstituyeron RNPs en células HEK 293T, ya que en el laboratorio se tenía puesto a punto un protocolo de transfección muy eficiente para estas células con el método de fosfato cálcico (Wigler et al, 1979). La generación de RNPs se llevó a cabo transfectando los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa y la NP bajo el promotor de *Citomegalovirus* (pCMV PB1, pCMV PB2HIS, pCMV PA y pCMV NP) y el RNA molde clon 23 clonado en el vector de

expresión pHH21 (pHH21 Δ NSRT clon 23) (ver [Materiales y Métodos](#)). La acumulación de RNPs se comprobó por WB y transcripción *in vitro* de los extractos celulares. Los resultados mostraron que con este sistema se obtenía una mayor cantidad de RNPs. Sin embargo, cuando se analizaron las RNPs purificadas en geles de poliacrilamida teñidos con plata, se observó que los contaminantes también se encontraban en grandes cantidades. Para eliminar dichos contaminantes de la muestra se probaron diferentes métodos de purificación (gradientes de glicerol, cromatografía de afinidad, exclusión molecular), pero pese a los esfuerzos realizados, no fue posible purificar las RNPs reconstituidas en células HEK 293T con las condiciones necesarias para su estudio por Crio-ME.

Entonces se decidió infectar las mismas células, HEK 293T, con el virus Vaccinia vTF7-3 y transfectar después los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2HIS, pGEM PA, pGEM NP y pT7 Δ NSRT clon 23, con fosfato cálcico. La infección viral secuestra la maquinaria celular inhibiendo la síntesis de proteínas celulares, y disminuyendo por tanto los contaminantes arrastrados durante la extracción celular. Los resultados mostraron que se obtenía de nuevo una gran cantidad de RNPs, pero sin embargo continuaba habiendo demasiados contaminantes, aunque se observó una mayor pureza cuando se analizaron las RNPs purificadas mediante geles de poliacrilamida teñidos con plata. También se llevaron a cabo algunas reconstituciones en las células BHK 21 (*Baby Hamster Kidney*). Sin embargo en estas células la transfección no resultó eficaz, ni con el método del fosfato cálcico, ni infectando con el virus Vaccinia vTF7-3 y transfectando después. Por otra parte, se reconstituyeron RNPs en células COS 1 transfectando los plásmidos pCMV PB1, pCMV PB2HIS, pCMV PA, pCMV NP y pHH21 Δ NSRT clon 23, con fosfato cálcico. No obstante, debido a que las células COS 1 no se transfectan tan bien como las HEK 293T, no se obtuvo una buena concentración de RNPs. Como

alternativa, se infectaron las células COS 1 con el virus Vaccinia vTF7-3 y después se transfectaron los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2HIS, pGEM PA, pGEM NP y pT7 Δ NSRT clon 23, con fosfato cálcico. Los resultados mostraron que este sistema producía también mayor cantidad de RNPs, pero continuaba siendo insuficiente para su estudio por Crio-ME.

1.1.2 RECONSTITUCIÓN ESTÁNDAR

Tras sucesivos intentos y mejoras en la reconstitución de las RNPs, en diferentes tipos celulares y con distintos sistemas de transfección, se ratificó que, aunque en algunos casos se podía obtener mayor cantidad de RNPs, no se podía mejorar la relación concentración/pureza que se obtenía en el sistema que se había venido utilizando anteriormente, en el que se infectaban las células COS 1 con vTF7-3 y se transfectaban con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa, la NP y el RNA molde, bajo el promotor de T7, con liposomas catiónicos (Martín-Benito et al, 2001; Ortega et al, 2000). Puesto que la concentración de RNPs que se había obtenido hasta entonces era insuficiente para llevar a cabo el estudio por Crio-EM, se escaló la producción hasta utilizar como rutina 1.2×10^8 células transfectadas (ver [Materiales y Métodos](#)) (Fig. MyM1).

1.2 PURIFICACIÓN DE RNPs

El sistema de purificación que se había utilizado anteriormente para obtener la muestra para microscopía electrónica, consistía en un doble gradiente de glicerol, el primero de velocidad, el segundo de densidad (Ortega et al, 2000), y después una cromatografía de afinidad, por medio de la etiqueta de histidinas presente en la subunidad PB2 (Area et al, 2004). En esta Tesis Doctoral se ha hecho especial hincapié en encontrar y optimizar el sistema de purificación que permitiera obtener una muestra altamente concentrada y muy pura,

con un alto rendimiento, y al mismo tiempo, que fuera reproducible y rápido. Se probaron varios métodos de purificación, basados en diferentes propiedades físicas y químicas de las RNPs.

1.2.1 SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS Y TAMPONES DE PURIFICACIÓN

En el laboratorio se utilizaban de rutina 2 tipos de cromatografía de afinidad, la purificación de polimerasa a través de la etiqueta TAP (*Tandem Affinity Purification*) presente en la subunidad PB1 (Jorba et al, 2008a; Jorba et al, 2008b; Torreira et al, 2007), y la purificación de RNPs y polimerasa a través de la etiqueta de histidinas presente en la subunidad PB2 (Area et al, 2004; Jorba et al, 2008a). De modo que lo primero que hicimos fue comprobar cual de los 2 tipos de cromatografía daba mejores resultados purificando RNPs recombinantes. Para ello se reconstituyeron 2 tipos de RNPs, RNPs-TAP y RNPs-HIS, como se ha mostrado anteriormente (ver Resultados 1.2 y Materiales y Métodos 1.1), y se purificaron en paralelo mediante cromatografía de afinidad, bien a través de la etiqueta TAP, o bien a través de la etiqueta de histidinas. Los resultados mostraron que la purificación de las RNPs-TAP siempre resultó muy reducida, y por tanto la concentración de RNPs purificadas por este método era escasísima. La cromatografía de afinidad por histidinas fue mucho mas eficaz para purificar RNPs, como ya se había demostrado anteriormente (Area et al, 2004), de modo que se optimizó al máximo este sistema. En primer lugar se decidió utilizar la cromatografía de afinidad como primer paso en la purificación de las RNPs. Al incrementar el número de células de partida para obtener mayor cantidad de RNPs, el volumen de los extractos celulares generados aumentaba considerablemente, lo que podía suponer un problema para cualquiera de los otros sistemas de purificación. Además, la cromatografía de afinidad es uno de los métodos mas eficaces de purificación, ya que su

alta especificidad impide continuar el proceso a la gran mayoría de los contaminantes. Para la purificación por histidinas que se llevaba a cabo en el laboratorio se usaba una concentración de 20mM imidazol durante la unión y el lavado de la resina, y 200mM imidazol en la elución (Area et al, 2004). Para optimizar este primer paso se eluyó la muestra con un gradiente de imidazol de 0 a 200 mM, comprobándose que las RNPs comenzaban a eluir a partir de 100mM imidazol. Por tanto se aumentó a 50mM la concentración de imidazol en el tampón de lavado, eliminando los contaminantes que no estuvieran fuertemente unidos a la resina, y se disminuyó a 150 mM la concentración de imidazol en el tampón de elución, impidiendo que otros contaminantes se eluyeran junto con las RNPs. Además se aumentó la concentración de detergente en los tampones a 0.5% Igepal, frente al 0,1% utilizado anteriormente, dado

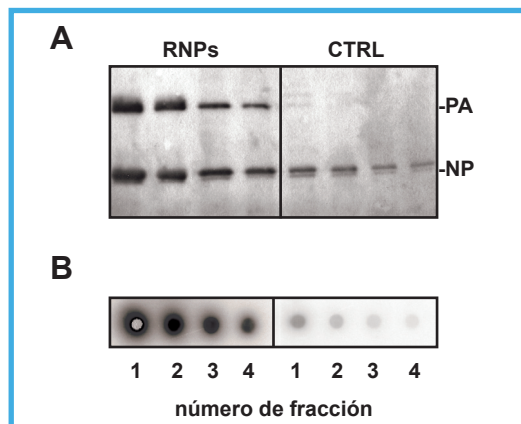


Figura R1. Purificación de RNPs recombinantes reconstituidas *in vivo* por cromatografía de afinidad. Se reconstituyeron RNPs-HIS como se indica en Materiales y Métodos y los extractos celulares se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa. Como control negativo se reconstituyeron RNPs silvestres y carentes de la etiqueta HIS. Los eluidos de la resina se analizaron en geles desnaturalizantes de poliácridamida-SDS. A) Western-blot anti-PA y anti-NP. La posición de las proteínas PA y NP se muestran a la derecha. B) Transcripción *in vitro*. El producto de las reacciones de síntesis *in vitro* marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP se filtró en una membrana de nylon y se sometió a autorradiografía usando un phosphorimager. RNPs, RNPs con etiqueta de histidinas en la subunidad PB2; CTRL, RNPs silvestres; 1-4, eluidos de la resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa.

que así se eliminaba mayor cantidad de contaminantes. Finalmente se sustituyó el NaCl por KCl y se aumentó la concentración del Tris-HCl pH 8.0 de 20mM a 50mM en el tampón de unión a la resina de Ni²⁺-NTA-agarosa, de manera que los tampones de unión, lavado y elución se diferenciaban únicamente en la concentración de imidazol. Se comprobó que estos cambios no afectaban al rendimiento de la purificación. Cada optimización de la cromatografía de afinidad se analizó mediante tinción de plata de geles de poliácridamida-SDS en los que se separaron las eluciones de la resina de Ni²⁺-NTA-agarosa. Este método revela la presencia de proteínas con gran sensibilidad, pudiendo detectar hasta 1ng de proteína. La tinción de plata de la eluciones mostró un enriquecimiento en la concentración de las proteínas de la polimerasa y la NP (datos no mostrados), que fue comprobado por WB y transcripción *in vitro* (Fig. R1), y un incremento considerable en la pureza de la muestra, aunque no fue suficiente para realizar el estudio de las RNPs por Crio-ME. Se requería un paso adicional de purificación que eliminara las proteínas contaminantes por otra característica.

Como ya se ha comentado, las RNPs se purificaban anteriormente con un gradiente de densidad y después con una cromatografía de afinidad (Area et al, 2004; Martín-Benito et al, 2001; Ortega et al, 2000). Se descartó la posibilidad de utilizar el gradiente como primer paso de la purificación, debido al aumento del número de células en la reconstitución. Se descartó también como paso adicional a la cromatografía de afinidad, ya que el glicerol impide la formación de hielo vítreo uniforme y por tanto es incompatible con la preparación de muestras para Crio-ME. Así, se decidió probar una cromatografía de exclusión molecular, que separa por tamaño. Para ello se reconstituyeron RNPs, se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de Ni²⁺-NTA-agarosa y las eluciones se filtraron en una columna de exclusión molecular equilibrada en el tampón de unión a la resina.

Las fracciones de la columna se analizaron por WB con anticuerpos específicos contra la polimerasa y la nucleoproteína para determinar las fracciones en las que se encontraban las RNPs (Fig. R2A). Las mismas fracciones se analizaron mediante transcripción *in vitro* comprobando que las RNPs se encontraban intactas y que eran biológicamente activas (Fig. R2B). Después se analizaron las fracciones recogidas mediante tinción de plata de geles de poliácridamida-SDS (Fig. R2C) y la tinción mostró que la filtración molecular eliminaba casi todas

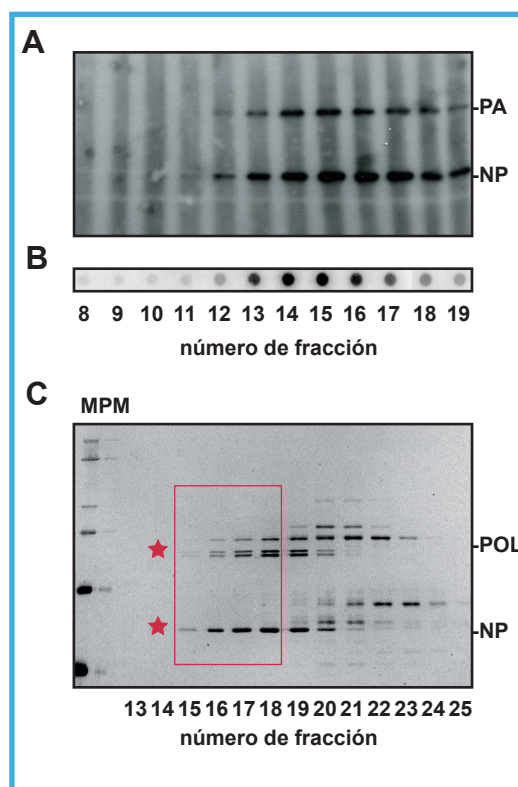


Figura R2. Purificación de RNPs recombinantes reconstituidas *in vivo* por filtración molecular. Se reconstituyeron RNPs y se purificaron por cromatografía de afinidad. El eluido con mayor concentración de RNPs se purificó por filtración molecular. Las fracciones de la columna se analizaron en geles de poliácridamida-SDS. A) Western-blot anti-PA y anti-NP de las fracciones 8-19 de una columna de Sephacryl S-300. B) Actividad transcripcional. C) Tinción de plata de las fracciones 13-25 de una columna de Sephacryl S-400, en la que se muestran las bandas correspondientes a la polimerasa (POL) y la nucleoproteína (NP) (estrellas). MPM, marcadores de peso molecular. El recuadro rojo indica las fracciones que se usaron en el siguiente paso de purificación (ver Fig. R3)

las proteínas contaminantes de las fracciones en las que se encontraban las RNPs. En ese momento se optó por optimizar esta técnica para la purificación exhaustiva de las RNPs. En primer lugar se comprobó cual era el tamaño de poro de la cama adecuado para filtrar moléculas de aproximadamente 1 MDa. Las resinas que separan mejor las moléculas de ese rango son la Sephacryl S-300 o la Sephacryl S-400. Las RNPs purificadas por cromatografía de afinidad se filtraron en cada una de las resinas y las fracciones fueron analizadas por electroforesis desnaturalizante y tinción de plata. La cama de Sephacryl S-400 mostró mejor separación entre las proteínas, por tanto decidimos incorporarla al protocolo (Fig. R2A y C). Por otro lado, el Igepal es un detergente polidisperso, y además puede formar micelas a la concentración utilizada. Los tampones con Igepal no son adecuados para la preparación de rejillas para Crio-ME, dado que las micelas impiden la congelación uniforme del tampón no permitiendo la formación de una capa uniforme de hielo vítreo. Por tanto se sustituyó el Igepal por Chaps, en el tampón

de la columna, a una concentración inferior a la crítica para la formación de micelas.

Tras la filtración las RNPs se encontraban distribuidas en 3 o 4 fracciones de la columna (Fig. R2). Como la preparación de rejillas para Crio-ME requiere poco volumen de muestra, en algunos casos se concentraron esas fracciones por medio de una segunda cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa en condiciones suaves (Fig. R3) (ver **Materiales y Métodos**, paso 3 de la Purificación).

1.2.2 PURIFICACIÓN ESTÁNDAR

Una vez hechos los cambios en las técnicas empleadas y habiendo optimizado al máximo cada paso y cada tampón empleado, se realizaron varias purificaciones y se comprobó que el sistema diseñado era exactamente lo que se requería, un método efectivo y reproducible que permitía obtener RNPs concentradas y puras, aptas para ser estudiadas por Crio-ME, en un espacio de tiempo relativamente corto. Debido a su reproducibilidad y buen rendimiento, este método de purificación se tomó como referencia para todos los estudios, tanto estructurales como bioquímicos posteriores. La purificación estándar, consiste pues en un primer paso de cromatografía de afinidad, en el que la elución más concentrada de RNPs se purifica mediante una columna de filtración molecular y, por ultimo, las 3 o 4 fracciones en las que se distribuyan la mayor parte de las RNPs se concentran con un segundo paso de cromatografía de afinidad (Fig. MyM3).

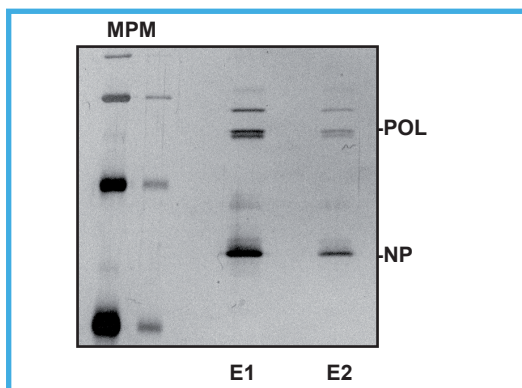


Figura R3. Concentración por cromatografía de afinidad de RNPs recombinantes reconstituidas *in vivo*. Se reconstituyeron RNPs y se purificaron por cromatografía de afinidad. El eluido con más cantidad de RNPs se sometió a filtración molecular. Las fracciones con mayor concentración de RNPs se concentraron por cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa en condiciones suaves. Los eluidos de la resina se analizaron por geles de poliacrilamida-SDS y tinción de plata. Se muestran las bandas correspondientes a la polimerasa (POL) y la NP. MPM, marcadores de peso molecular, E1 y E2, eluidos de la resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa.

2. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RNP RECOMBINANTE

2.1 MODELO DE LA RNP POR ME DE MUESTRAS TEÑIDAS

El programa que se utilizó para procesar las imágenes obtenidas en el microscopio, SPIDER

(Frank et al, 1996), requiere un modelo inicial del espécimen para su posterior procesamiento informático. De modo que el estudio de la RNP mediante Crio-ME demandaba, además de una concentración y pureza determinadas, un modelo de la RNP realizado en el mismo microscopio. La estructura de la RNP previamente publicada se realizó utilizando un microscopio JEOL 1200 EXII (Martín-Benito et al, 2001) y la Crio-ME se llevaría a cabo en un microscopio Philips Tecnica G² equipado con cañón de emisión de campo (FEG). Por tanto, como paso previo a la Crio-ME, era necesario obtener un modelo de microscopía electrónica de la RNP empleando las mismas condiciones en las que se realizaría la Crio-ME. El abordaje de esta tarea se hizo empleando una técnica clásica y de sencilla ejecución como es la tinción negativa. Así pues, mientras se optimizaba la purificación de las RNPs se utilizaron esas muestras para preparar rejillas teñidas negativamente para microscopía electrónica. Se tomaron 24 micrografías, en condiciones de mínima dosis, de las que se extrajeron un total de 1652 imágenes individuales (Fig. R4A) que

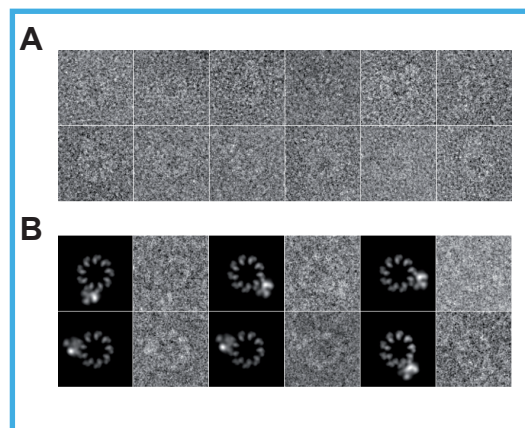


Figura R4. Galería de imágenes de RNPs recombinantes reconstituidas *in vivo*. Las RNPs se reconstituyeron *in vivo* y las muestras purificadas y concentradas se analizaron por. A) ME de tinción negativa. Galería de algunas imágenes utilizadas para la obtención del nuevo modelo de la RNP de ME de tinción negativa. B) Crio-ME. Los paneles de la derecha muestran imágenes obtenidas mediante Crio-ME, los de la izquierda representan las proyecciones correspondientes del modelo final, para facilitar su observación. Todas las imágenes se tomaron a una magnificación de 50000 aumentos.

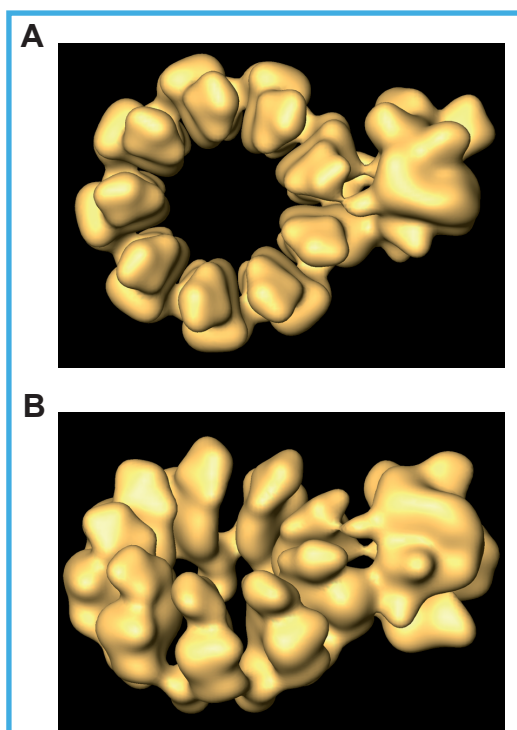


Figura R5. Reconstrucción tridimensional de una RNP recombinante del virus de la gripe reconstituida *in vivo*, mediante ME de muestras teñidas. El volumen de la RNP se presenta en distintas vistas donde se observa el anillo de 9 monómeros y las estructura de la polimerasa unida a 2 de estos monómeros. A y B, vista frontal y en perspectiva del volumen final después de simetrizar e incluir la polimerasa re-procesada. La resolución es de 20 Å para el anillo de NP y 24 Å para el complejo de la polimerasa.

fueron procesadas. El volumen final se obtuvo fusionando el mapa del anillo de NP, generado mediante un refinamiento en el cual se impuso simetría 9, y el mapa de la polimerasa, resultado de un procesamiento sin imponer simetría (Fig. R5). Gracias a la utilización del microscopio FEG y al aumento del número de imágenes, se incrementó la resolución de la estructura de la RNP, alcanzándose 20 Å para el anillo de NP y 24 Å para el complejo de la polimerasa, frente a los 27 Å y 33 Å respectivamente, que tenía el modelo previo (Martín-Benito et al, 2001). En esta nueva estructura se puso de manifiesto que la polimerasa no era una masa compacta y que los contactos que establece con el anillo de NP eran diferentes, siendo uno de mayor intensidad que el otro (Fig. R5).

2.2 ESTRUCTURA DE LA RNP POR CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Una vez generado el mapa que serviría como modelo inicial se emprendió el estudio de la RNP mediante Crio-ME. Para ello se seleccionaron 9571 imágenes individuales de las 150 micrografías tomadas en diferentes sesiones (Fig. R4B). Las imágenes se procesaron mediante dos refinamientos diferentes e independientes, imponiendo o no simetría 9. El procesamiento en el que se impuso simetría dio como resultado una reconstrucción en la cual se perdía la información de la polimerasa pero se aumentaba considerablemente la resolución en el anillo de NP (Fig. R6B). Por el contrario, el procesamiento sin simetría permitió la reconstrucción de la partícula completa pero con una resolución menor (Fig. R6A).

La estructura final se obtuvo fusionando los siete monómeros de NP no conectados a la

polimerasa, provenientes del procesamiento con simetría, y el complejo de la polimerasa y dos monómeros adyacentes, provenientes del procesamiento sin simetría (Fig. R7). La resolución del volumen se determinó con un valor de corte de 0.3 en la función *Fourier Shell Correlation* (FSC) (Fig. R8). Debido a que la estructura final está compuesta por 2 modelos provenientes de procesamientos diferentes, la resolución de cada parte es distinta, siendo 18 Å para el no simetrizado y 12 Å para el simetrizado (Fig. R8). En las imágenes de la estructura de la RNP (Fig. R7), se puede observar que cada monómero de NP está formado por dos dominios, cabeza y cuerpo. En el cuerpo aparece una pequeña masa protuberante en la parte inferior. Los monómeros de NP están conectados entre sí por la zona media, donde se conectan la cabeza y el cuerpo, de la molécula; sin embargo, al representar la estructura de la RNP con un umbral menor podemos observar que aparece una nueva conexión que une las cabezas de los monómeros, sugiriendo que esta

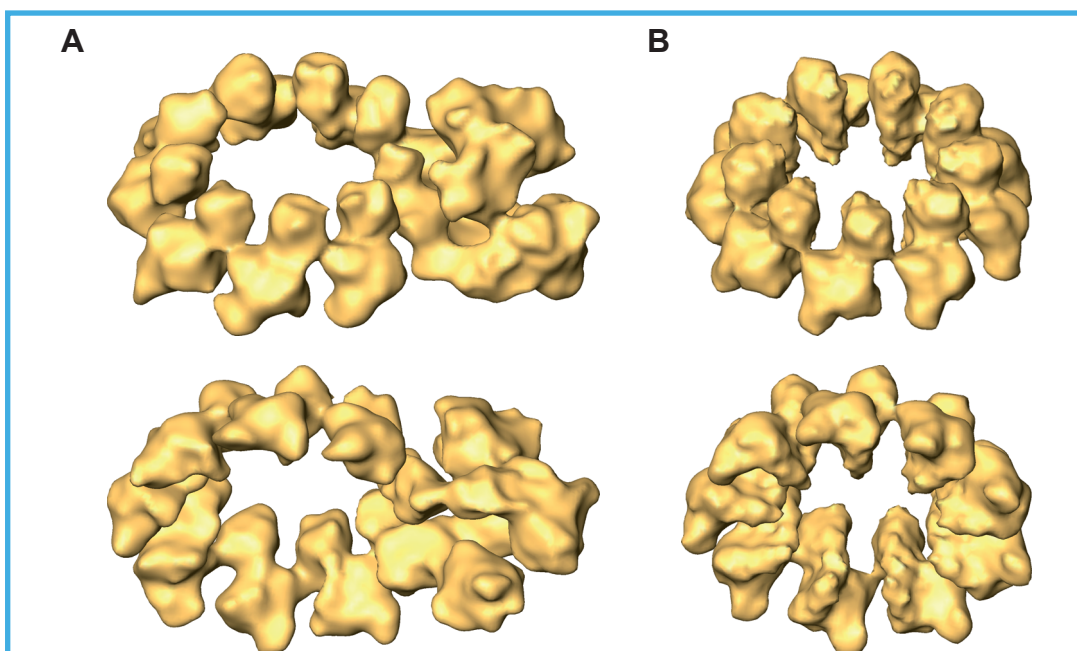


Figura R6. Reconstrucción tridimensional de una RNP recombinante reconstituida *in vivo*, mediante Crio-ME. Modelos tridimensionales obtenidos tras los refinamientos con y sin imponer simetría 9. Perspectiva superior e inferior de. A) reconstrucción completa de la RNP sin simetría, y B) reconstrucción del anillo con simetría 9. La resolución es de 18 Å para la RNP completa y 12 Å para el anillo de NP simetrizado.

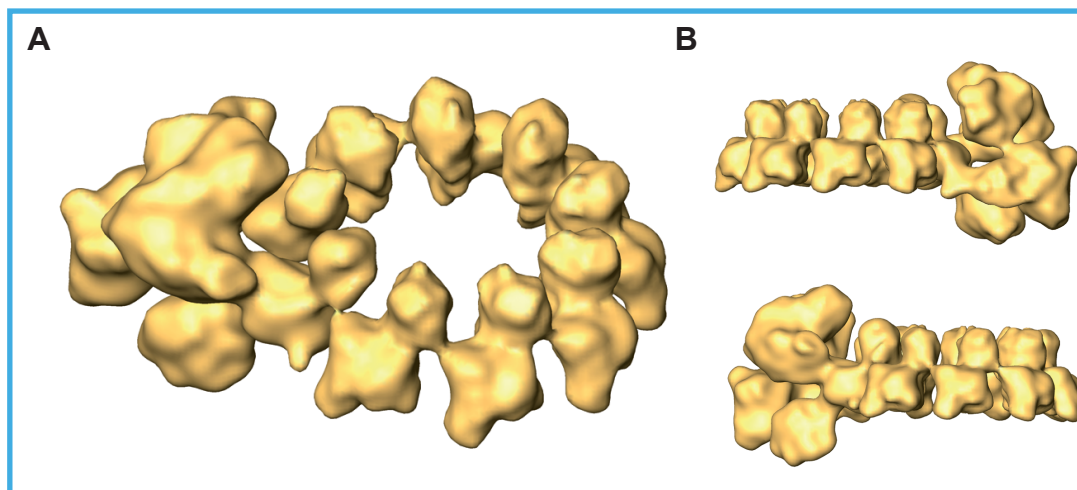


Figura R7. Estructura tridimensional de una RNP recombinante reconstituida *in vivo*. Estructura final de la RNP compuesta por 7 monómeros de NP no conectados a la polimerasa, provenientes del procesamiento con simetría, y el complejo de la polimerasa con 2 monómeros adyacentes, provenientes del procesamiento sin simetría. A) Vista en perspectiva, B) vistas laterales.

interacción podría estar formada por cadenas de aminoácidos flexibles (Fig. R10B). El complejo de la polimerasa está conectado con 2 monómeros de NP no conectados entre sí.

2.3 LOCALIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES EN LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE LA POLIMERASA

La estructura del complejo de la polimerasa se asemeja, como era de esperar, a las estructuras anteriormente publicadas, obtenidas mediante ME de tinción negativa (Area et al, 2004; Torreira et al, 2007). La comparación entre la nueva estructura de la polimerasa y la obtenida por Area y col. permitió la identificación de las distintas subunidades, definidas en dicho artículo por la interacción específica con anticuerpos monoclonales y etiquetas (Fig. R9A). El aumento de la resolución permitió realizar un *docking* de la estructura atómica del dímero PA(C)-PB1(N) (He et al, 2008; Obayashi et al, 2008), que fue consistente con la localización de esas mismas subunidades previamente determinada (Fig. R9B) (Area et al, 2004). Este *docking* sugiere que la mayor parte de las subunidades PB1 y PA se encuentra situada en la parte superior

de la polimerasa, mientras que PB2 podría encontrarse en la parte inferior. La conexión de la polimerasa con el anillo de NP tiene lugar a través de 2 interacciones diferentes, una entre la subunidad PB1 y NP, y otra entre la subunidad PB2 y NP, menos intensa, aparentemente en la estructura, que la primera (Fig. R6A y R7).

2.4 DOCKING DE LA ESTRUCTURA ATÓMICA DE LA NP EN EL ANILLO DE NP

La publicación de la estructura atómica de la NP (Ye et al, 2006) permitió realizar un *docking* en la reconstrucción tridimensional del anillo de NP. La realización de este tipo de ajustes permite no sólo obtener datos de interés biológico, sino también la validación de la estructura de Crio-ME. En la imagen (Fig. R10) se puede observar como los 2 dominios de la estructura atómica encajan en el volumen del monómero de NP. Sin embargo se advierten unas masas adicionales, tanto en la parte superior como en la inferior, de cada monómero de NP. Se consideró la posibilidad de que las masas extra superior e inferior, así como la conexión entre NPs adyacentes surgieran como consecuencia del modelo inicial utilizado.

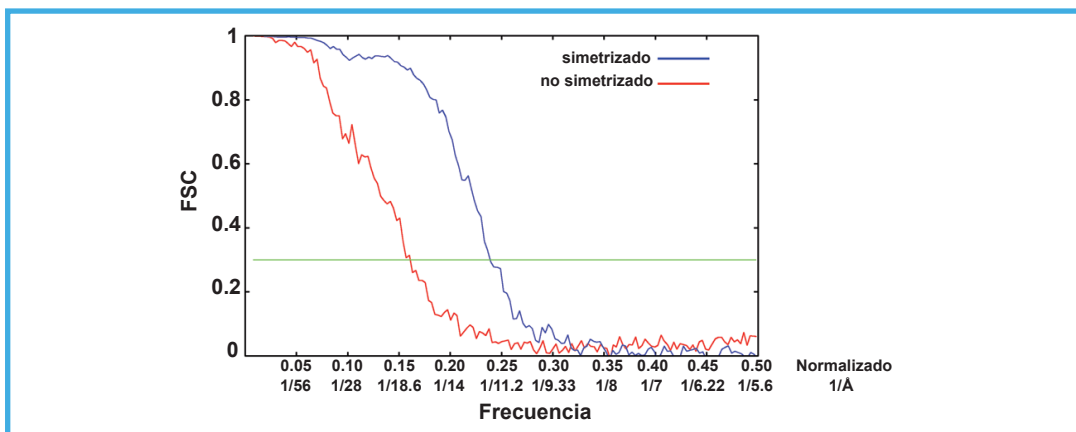


Figura R8. Determinación de la resolución. Valores de *Fourier Shell Correlation* representados frente a la frecuencia normalizada a 0,5 para la reconstrucción con simetría 9 (línea azul) y de la reconstrucción sin simetría (línea roja). La inversa de la resolución se indica debajo de cada frecuencia. Línea verde, punto de corte para FSC=0.3.

Las estructuras obtenidas por ME de tinción negativa pueden tener un problema conocido como “cono perdido”, producido por la caída preferencial del espécimen sobre la rejilla, que conlleva una pérdida de información en el proceso de reconstrucción y como consecuencia un posible alargamiento de la estructura. Para descartar esta posibilidad, se verificó que el rango de inclinación del conjunto de imágenes individuales obtenidas por Crio-ME mostraba una distribución angular suficientemente amplia (Fig. R11), como para descartar el cono

perdido como explicación a las masas extra. Además, se llevó a cabo un refinamiento en el que se utilizaron las mismas imágenes de partida y un anillo generado con 9 monómeros de la estructura atómica de la NP filtrado a 30 Å como modelo inicial (Fig. R7). Se propuso que la masa adicional que aparece en la parte superior del volumen de NP corresponde a las regiones no resueltas de la estructura atómica (Ye et al, 2006), mientras que la masa adicional de la parte inferior podría comprender la región N-terminal de la proteína, que no está resuelta, además

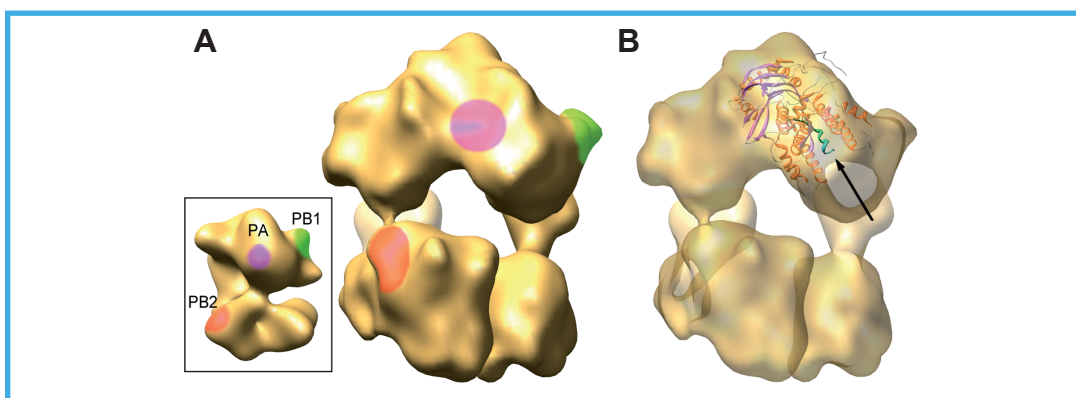


Figura R9. Docking de la estructura atómica del complejo PA-PB1 en la estructura de la RNP. A) Vista frontal de la polimerasa de la estructura de la RNP por Crio-ME con la localizaciones inferidas del modelo de tinción negativa. El cuadro interior muestra la estructura de la polimerasa publicada por Area et al. (Area et al, 2004). La mano de la estructura se ha cambiado ya que el *docking* de la estructura atómica de NP determinó que la polimerasa publicada tenía la mano al revés. Localización de los dominios específicos de las subunidades de PB1 (verde), PB2 (rojo) y PA (violeta). B) Misma vista frontal de la polimerasa con el *docking* del dímero PA(C)-PB1(N) (He et al, 2008). La flecha indica el N-terminal de PB1, resaltado en verde.

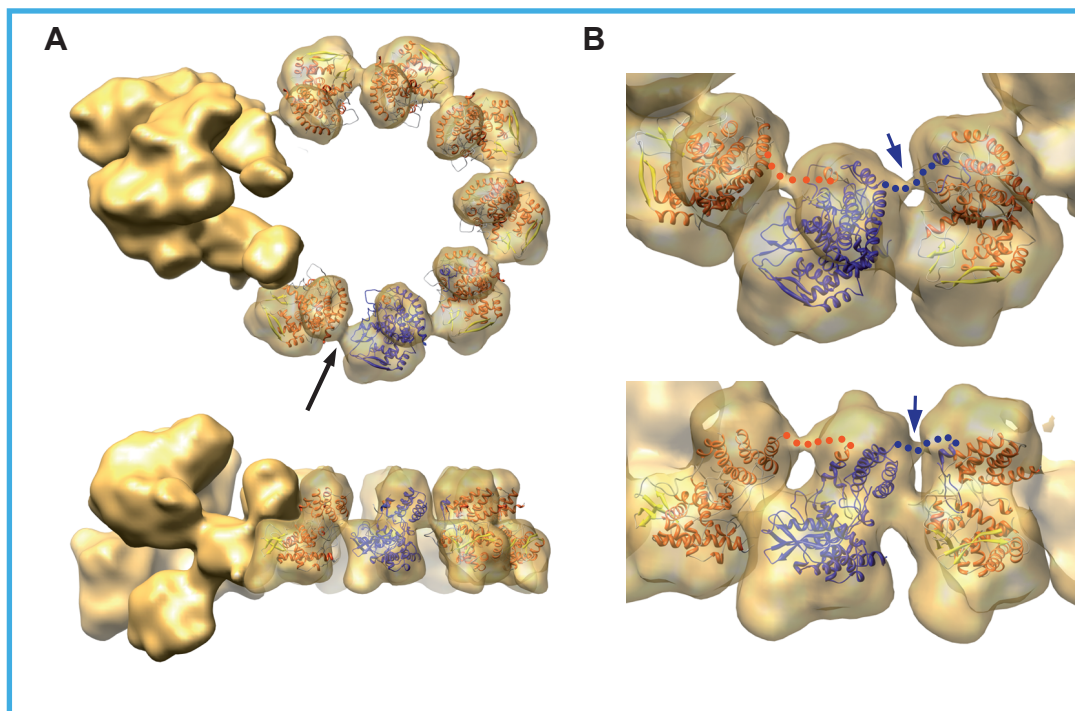


Figura R10. Docking de la estructura atómica de los monómeros de NP en el modelo de la RNP. A) Estructura atómica de la NP (Ye et al, 2006) representada dentro del volumen de cada uno de los monómeros de NP provenientes de la reconstrucción con simetría. Vista superior y lateral. Se ha resaltado en azul un monómero para visualizar el lazo que conecta con el monómero adyacente. La flecha señala la hipotética conexión entre monómeros vía RNA. B) Detalle de 3 monómeros representados con un umbral de $\sigma=1.5$. Vista superior y lateral. La flecha azul señala la conexión entre monómeros de NP en la parte superior. La línea de puntos señala la supuesta conexión entre la cabeza de un monómero de NP y el lazo insertado en el monómero siguiente.

del RNA genómico. El RNA es más denso que las proteínas, por tanto si el RNA estuviera ubicado en la parte inferior del anillo, ésta debería ser más densa que el resto. Por ello se disminuyó el umbral con el que se representa el volumen de la RNP y se observó que la masa inferior extra de la NP no desaparece, sugiriendo que es una masa de alta densidad. Para comprobar esta hipótesis se realizaron diferentes aproximaciones que se detallan más adelante.

Ye y col. propusieron que la polimerización de la NP se llevaba a cabo a través de la interacción del lazo que comprende los aminoácidos 402-428 de un monómero con el monómero adyacente (Ye et al, 2006). En el *docking* de la estructura atómica en el anillo de NP se conservan las interacciones entre los monómeros, pero con un ángulo de interacción diferente, que pasó de

120° en el trímero presente en el cristal a 40° en el anillo de NP (Fig. R10). Esta interacción permite una conexión probablemente mucho más real que la presente en el trímero, una estructura altamente tensionada, no detectada in vivo, y de la que no se muestran datos funcionales. Dicha diferencia de ángulo tan sólo implica un pequeño cambio en la disposición de las conexiones entre el lazo y el cuerpo de la NP (posiciones del 428 al 438 y del 396 al 402). De cualquier modo, estas interacciones están compuestas por cadenas sencillas de aminoácidos altamente flexibles, por lo que no pudieron ser resueltas en la estructura atómica (Ye et al, 2006). En la estructura de Crio-ME tampoco pudieron ser detectadas al umbral representado ($\sigma=2.5$) (Fig. R10A), sin embargo se hicieron claramente visibles cuando se disminuyó el umbral ($\sigma=1.5$) (Fig. R10B).

2.5 ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DEL RNA EN LA RNP DEL VIRUS DE LA GRIPE

Las estructuras atómicas de la NP de los virus VSV y Rabia han sido co-cristalizadas junto con el RNA (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006). Así pues, uno de los motivos por los que se decidió aumentar la resolución de la estructura, era para localizar la situación del RNA en la RNP del virus de la gripe. Por las características de la técnica de Crio-ME y la alta densidad del RNA, con respecto a la de la proteína, esperábamos poder visualizarlo directamente en la estructura. Sin embargo, las peculiaridades del espécimen con que trabajamos (flexibilidad, tamaño, número de partículas, etc), han impedido que se obtenga una resolución suficiente como para localizar con exactitud el material genético. Como ya se ha comentado anteriormente en el *docking* de la estructura atómica de la NP en la estructura

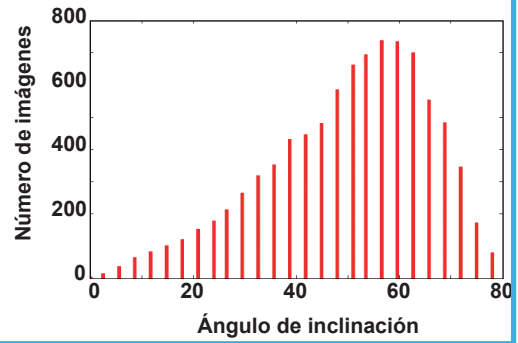
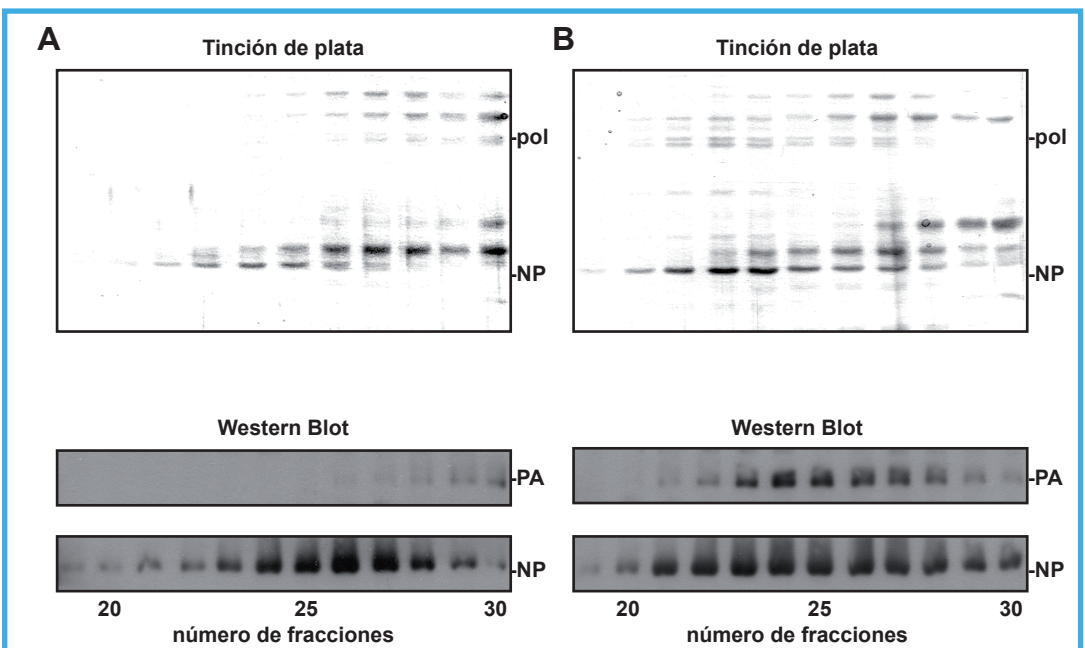


Figura R11. Distribución de los ángulos de inclinación en la reconstrucción tridimensional. Se muestra la distribución de los ángulos de inclinación asignados a las imágenes tras del refinamiento.

del anillo, la masa extra que sobresale por el extremo inferior de la estructura atómica se supone puede contener el RNA genómico. En las otras 2 estructuras publicadas, el RNA recorre un surco localizado entre los 2 dominios de la superficie interior de la NP, de forma que el RNA está completamente protegido. Sin embargo

Figura R12. Dependencia de RNA de la estructura de la RNP. A) Se reconstituyeron RNPs recombinantes *in vivo* y, tras una cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa, las RNPs se trataron con RNasa A (1.2 mg/ml) y RNasa T1 (30 u/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, las RNPs tratadas se separaron por filtración molecular en una columna de Sephacryl S300. Las fracciones se analizaron en geles de poliácridamida-SDS y se revelaron por tinción de plata y Western-blot con anticuerpos anti-PA y anti-NP. B) Como control se incubaron RNPs purificadas en ausencia de RNAsas.



la RNP de gripe es sensible a RNAsa (Baudin et al, 1994), lo que significa que el RNA debe de estar expuesto. Para comprobar la dependencia de RNA de la estructura de la RNP de gripe, se purificaron RNPs por cromatografía de Ni^{2+} -NTA-agarosa, se trataron con RNAsa T1 y RNAsa pancreática y se analizaron por filtración molecular. Los resultados (Fig. R12) indicaron que la interacción entre el complejo de la polimerasa y el anillo de NP es dependiente de RNA, ya que ambas estructuras pueden ser separadas tras una digestión con RNAsa. Además se analizó la longitud de los fragmentos de RNA, tratados o no con RNAsa, encontrándose una banda resistente de unos 18 nt (Fig. R13). Anteriormente se había determinado la asociación de una media de 24 nt por monómero de NP (Ortega et al, 2000), por lo que nuestros datos sugieren que la mayor parte del RNA se encuentra uniformemente distribuido

por la RNP y protegido por la NP, excepto 6 nt que deben estar expuestos y accesibles a las RNAsas. Actualmente se están realizando ensayos para determinar la estructura del anillo de NP digerido con RNAsas. La diferencia entre dicha estructura y la del anillo de la RNP aquí presentada, podría arrojar luz sobre la ubicación del RNA expuesto.

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RNP DEL VIRUS DE LA GRIPE

El aumento de la resolución no sólo permitió conocer más a fondo la estructura de la RNP, sino que nos dió la oportunidad de profundizar en las funciones de replicación y transcripción que son la base del funcionamiento de virus. Gracias al *docking* de la estructura atómica de la NP en el volumen de los monómeros se pudieron hacer predicciones de la zonas de contacto entre monómeros adyacentes de NP y entre la NP y la polimerasa. Para estudiar la importancia de estas interacciones en replicación y en transcripción se realizaron una serie de mutantes puntuales en dichas zonas.

1. MUTANTES DE NP EN LA ZONA DE INTERACCIÓN NP-NP

En primer lugar se estudió la interacción NP-NP. Para ello se mutaron diferentes posiciones del lazo de conexión, sustituyendo tanto aminoácidos conservados como no conservados (Fig. R14), y se ensayó la actividad biológica de las RNPs reconstituidas con estos mutantes. Así pues se reconstituyeron RNPs recombinantes en células COS 1 con los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2-HIS, pGEM PA, pT7NSCAT RT y el pGEM NP silvestre, como control negativo se reconstituyeron RNPs sin NP. Se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT mediante ensayo ELISA. Los resultados mostraron que los mutantes F412A y

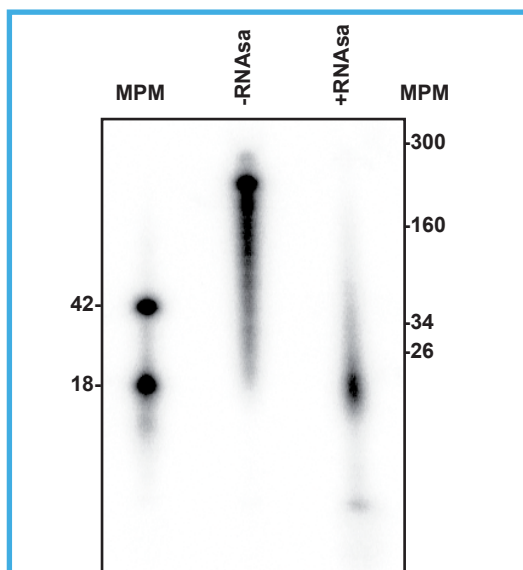


Figura R13. Análisis del tamaño del RNA presente en la RNP tras el tratamiento con RNAsas. Se extrajo el RNA de las RNPs purificadas y tratadas con RNAsas que se muestran en la Fig. R12 y se marcó radiactivamente en su extremo 5'-terminal con γ - ^{32}P -ATP. Los productos de digestión se analizaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida y autorradiografía. Oligonucleótidos marcados radiactivamente; -RNAsa, RNPs purificadas incubadas en ausencia de RNAsas; +RNAsa, RNPs purificadas incubadas con RNAsas; PM, peso molecular. A la izquierda y derecha de la imagen se indican las movilidades de los marcadores de longitud conocida (en nucleótidos).

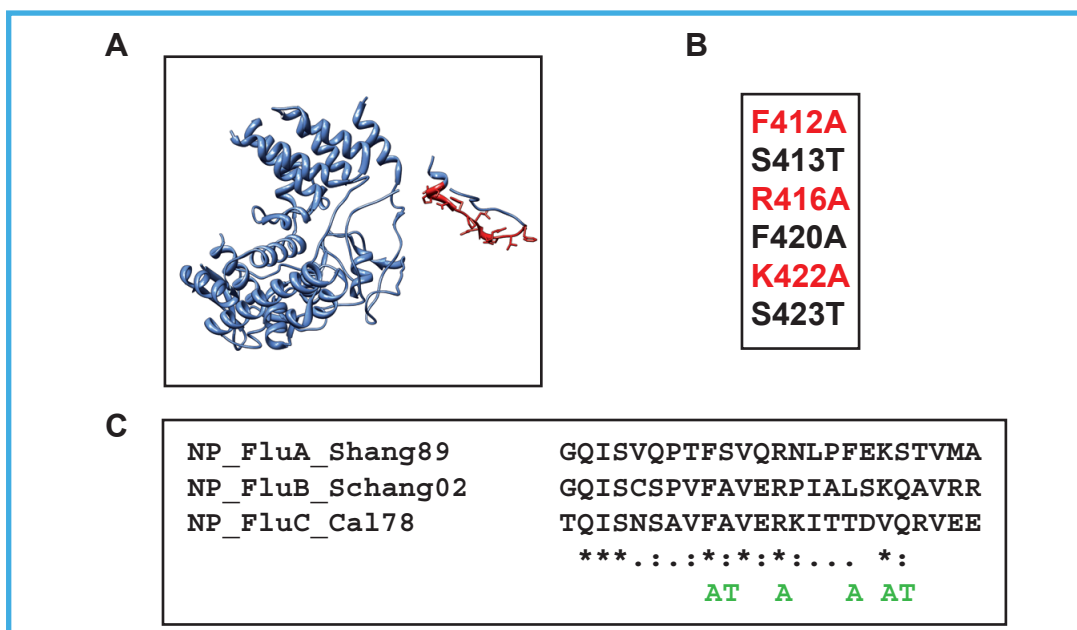


Figura R14. Análisis mutacional del sitio de interacción NP-NP. A) Vista de la estructura atómica de la NP (Ye et al, 2006), en la que se han realizado los aminoácidos del lazo de conexión NP-NP. B) Mutaciones introducidas, cambios no conservativos en posiciones conservadas (en rojo) y cambios conservativos en posiciones no conservadas (en negro). C) Alineamiento de secuencias relevantes de los virus de tipo A, B y C, indicando las mutaciones del panel B.

R416A estaban muy afectados, ya que se anulaba por completo la actividad de las RNPs (Fig. R15). Para comprobar si este defecto de actividad biológica se debía a defectos en la replicación, se generaron RNPs *in vivo* infectando cultivos de células COS 1 con vt7F-3 y transfecando los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2-HIS, pGEM PA, pT7ΔNSRT clon 23 y el pGEM NP silvestre o sus respectivos mutantes, y se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de Ni²⁺-NTA-agarosa. La acumulación de RNPs se determinó por WB usando anticuerpos anti-NP, y se observó que los mutantes R416A y F412A estaban fuertemente afectados en replicación, mientras que los mutantes S413T, F420A, K422A y S423T tenían un fenotipo silvestre (Fig. R16A). Estos resultados confirmaron la importancia de la interacción entre el residuo R416 del lazo de un monómero y el residuo E339 del monómero adyacente (Ye et al, 2006). Sin embargo mientras que el residuo F420 no desempeña ningún papel relevante en la interacción NP-NP en la RNP, el mutante F412A mostró un fenotipo

afectado indicando que este residuo debe de ser importante para la replicación viral. Para analizar más exhaustivamente el fenotipo de los

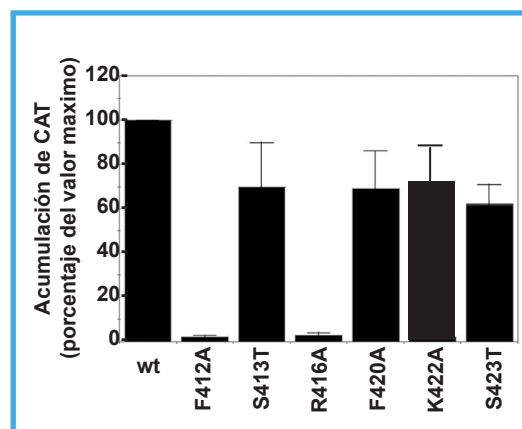


Figura R15. Actividad biológica de las RNPs con los mutantes de NP en el sitio de interacción NP-NP. Se generaron RNPs recombinantes *in vivo* con el replicón viral de *cat* y la NP silvestre o los respectivos mutantes, y se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT mediante ELISA. En la gráfica se muestran los valores de acumulación de proteína CAT de las RNPs mutantes con respecto a la silvestre como porcentaje del valor obtenido con la NP silvestre. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos diferentes.

mutantes se determinó la actividad biológica de las RNPs purificadas por transcripción *in vitro* (Fig. R16B). Los resultados fueron consistentes con la deficiencia de replicación observada para los mutantes R416A y F412A. Las mutaciones introducidas en la zona de interacción podrían estar causando un déficit en la replicación como consecuencia de un defecto en la capacidad de polimerización de estos mutantes. Para examinar su capacidad de polimerización, se expresó la NP silvestre o los mutantes en células COS 1 (Fig. R17A) y los extractos celulares se analizaron por filtración molecular tras un tratamiento con RNasa. En estas condiciones la NP silvestre forma grandes complejos, es decir, polímeros de NP. El mutante R416A, que anteriormente se había demostrado que era deficiente en la asociación NP-NP (Ye et al, 2006), permaneció

como monómero (Fig. R17B). El fenotipo de los demás mutantes se correlacionó con su actividad replicativa *in vivo*, es decir, el mutante F420A mostró un fenotipo silvestre mientras que el mutante F412A exhibió un fenotipo intermedio, es decir que aunque fue capaz de polimerizar, no formó grandes complejos, indicando que la interacción NP-NP que forma es muy lábil.

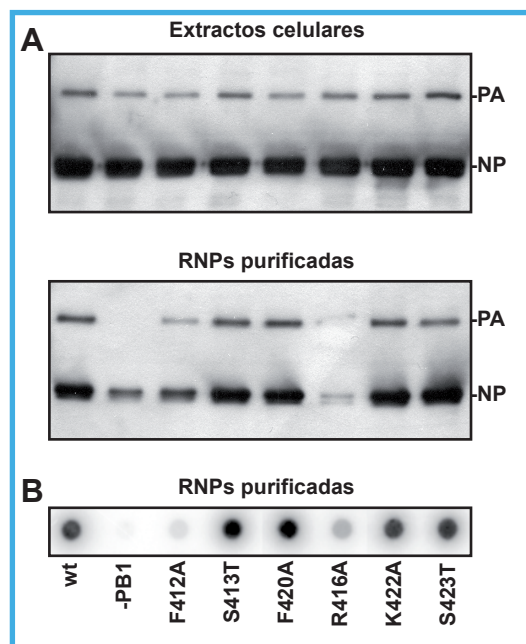


Figura R16. Fenotipo de las RNPs recombinantes reconstituidas con los mutantes de NP en el sitio de interacción NP-NP. A) Se reconstituyeron RNPs *in vivo* usando NP silvestre o mutante, tal y como se indica en la parte inferior. La acumulación de PA y NP se determinó mediante WB con anticuerpos específicos, tanto en los extractos celulares como en las preparaciones purificadas por cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa. La posición de PA y NP se indica a la derecha de la figura. B) Determinación de la concentración de RNPs purificadas por transcripción *in vitro*.

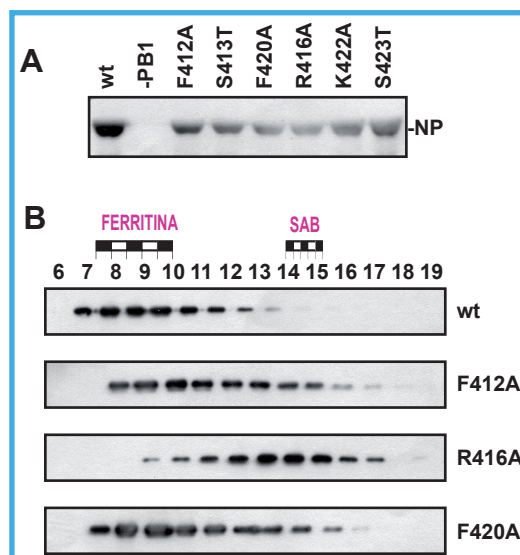


Figure R17. Polimerización de la NP silvestre o los mutantes. A) La expresión de NP se determinó por WB de los extractos de células COS1 en los que se expresó la NP silvestre o los mutantes. B) Estado de agregación de los mutantes de NP. La oligomerización de NP se determinó por filtración molecular en columna de Sephacryl S-300, tras un tratamiento con RNasa. Se muestra el resultado del WB anti-NP de las fracciones de la columna. En la parte superior se muestra la posición de los marcadores utilizados para calibrar la columna, ferritina (440 kDa) y seroalbúmina bovina (SAB; 67 kDa).

2. MUTANTES DE NP EN LA ZONA DE INTERACCIÓN NP-POLIMERASA

El complejo de la polimerasa viral interacciona con la NP mediante uniones establecidas con PB1 y PB2, mientras que PA no interacciona con NP (Biswas et al, 1998). En la estructura de la RNP se observa claramente que la interacción NP-PB2 es más ligera, incluso se podría pensar que están conectadas tan solo a través del RNA, mientras

que por el contrario, la unión NP-PB1 es mucho más sólida, como una auténtica interacción proteína-proteína. Gracias al *docking* de la estructura atómica de NP en los monómeros se predijeron 2 zonas que podrían estar implicadas en ambas interacciones. De la misma manera que para comprobar la interacción NP-NP, se llevaron a cabo mutaciones puntuales conservadoras y no conservadoras (Fig. R18). Se reconstituyeron RNPs recombinantes en células COS 1 con los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2-HIS, pGEM PA, pT7NSCAT RT y el pGEM NP silvestre o sus respectivos mutantes, y se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT mediante ensayo ELISA. Los resultados mostraron que únicamente los mutantes W104A y E369A

estaban afectados, aunque no se anulaba por completo la actividad de las RNPs reconstituidas con dichos mutantes (Fig. R19A). El resto de los mutantes mostró una disminución entre un 60 y 50% en la actividad respecto a las RNPs silvestres. Para comprobar si las zonas predichas estaban implicadas en la interacción con la polimerasa era necesario obtener unos mutantes que anulasen completamente la actividad de las RNPs. Para ello se construyeron dobles mutantes entre los que mostraron el fenotipo mas acusado, R98A+E369A y W104A+E369A. Se reconstituyeron RNPs recombinantes en células COS 1 con los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2-HIS, pGEM PA, pT7NSCAT RT y el pGEM NP silvestre o los dobles mutantes. Como control negativo se reconstituyeron RNPs sin NP.

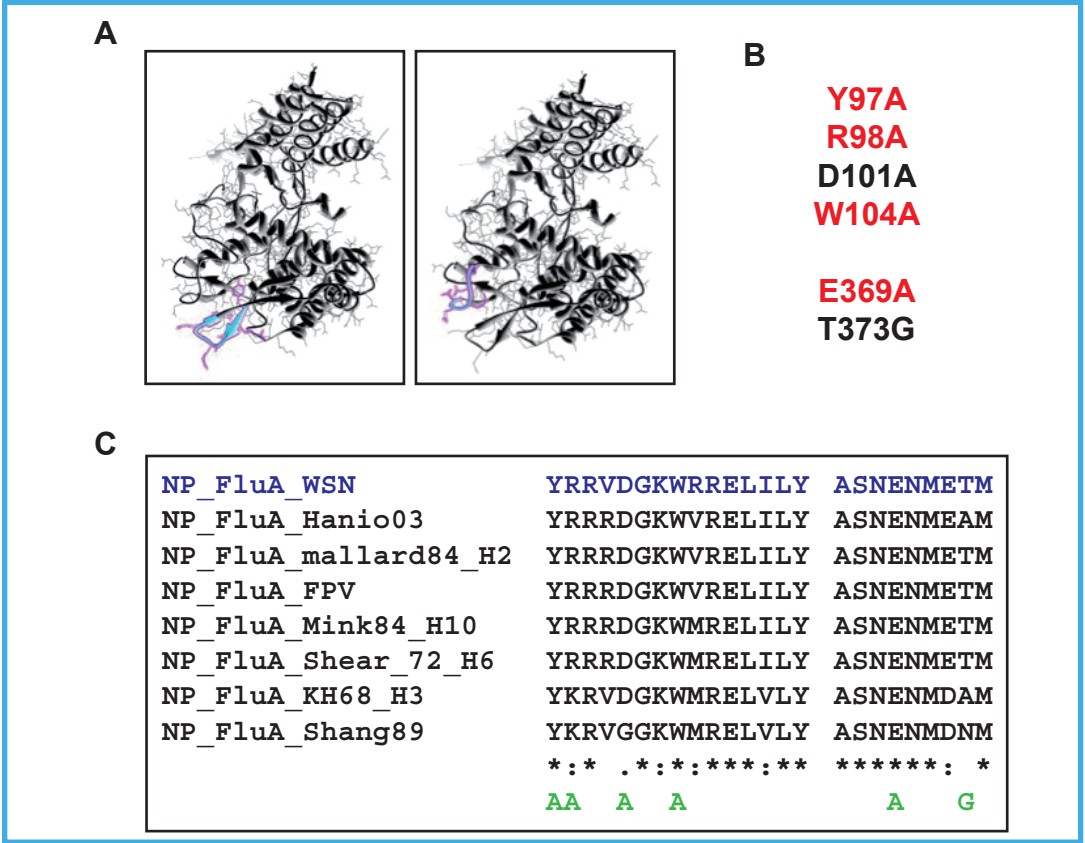


Figura R18. Análisis mutacional del sitio de interacción NP-polimerasa. A) Vista de la estructura atómica de la NP (Ye et al, 2006), en la que se han realizado las supuestas zonas de interacción NP-pol. B) Mutaciones introducidas, cambios no conservadores en posiciones conservadas (en rojo) y cambios conservadores en posiciones no conservadas (en negro). C) Alineamiento de secuencias relevantes de los virus de tipo A destacando las mutaciones del panel B.

Se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT mediante ensayo ELISA. Los resultados mostraron que ambos mutantes estaban muy afectados, especialmente el mutante W104A+E369A, ya que anulaba por completo la actividad

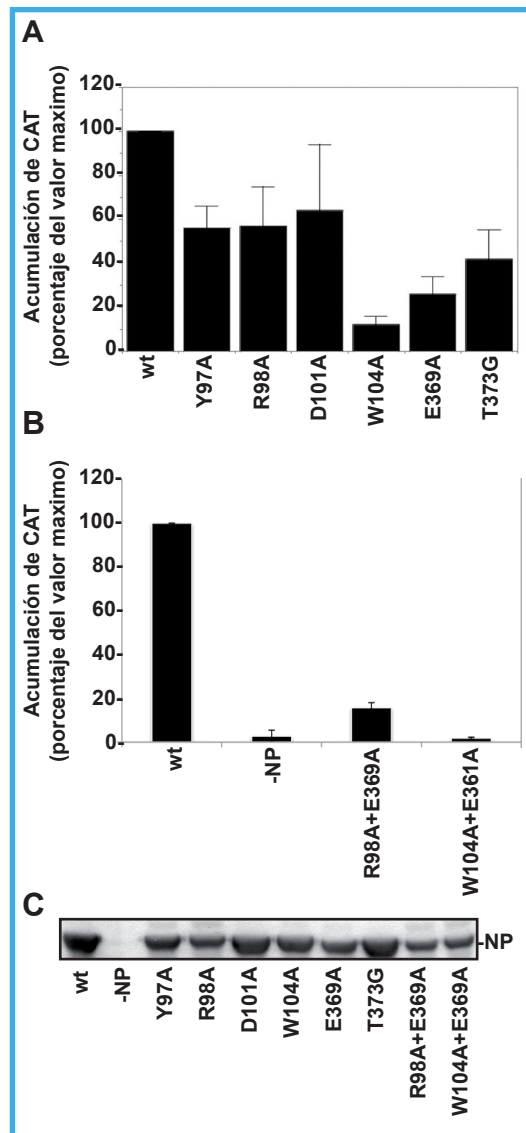


Figura R19. Actividad biológica de las RNPs con los mutantes de NP en el sitio de interacción NP-polimerasa. Se generaron RNPs recombinantes *in vivo* con el replicón viral de *cat* y la NP silvestre o los respectivos mutantes, y se determinó la actividad biológica midiendo la acumulación de proteína CAT mediante ELISA. En las gráficas A) y B) se muestran los valores de acumulación de proteína CAT de las RNPs mutantes con respecto a la silvestre, como porcentaje del valor obtenido con la NP silvestre. C) Expresión de NP de los distintos mutantes.

de las RNPs (Fig. R19B). Se comprobó que la expresión de NP fuera similar en todos los casos transfectando los distintos mutantes en células COS 1 (ver Materiales y Métodos) (Fig. R19C). Para comprobar si estos mutantes afectaban la replicación de las RNPs, se generaron RNPs *in vivo* infectando cultivos de células COS 1 con vT7F-3 y transfectando los plásmidos pGEM PB1, pGEM PB2-HIS, pGEM PA, pT7ΔNSRT clon 23 y el pGEM NP silvestre o sus respectivos mutantes, y se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de Ni²⁺-NTA-agarosa. La acumulación de RNPs se determinó por WB con anticuerpos anti-NP y anti-PA y los resultados mostraron que los mutantes W104A, R98A+E369A y W104A+E369A estaban fuertemente afectados en replicación (Fig. R20A). Además se determinó la actividad biológica de las RNPs purificadas mediante transcripción *in vitro* (Fig. R20B) y los

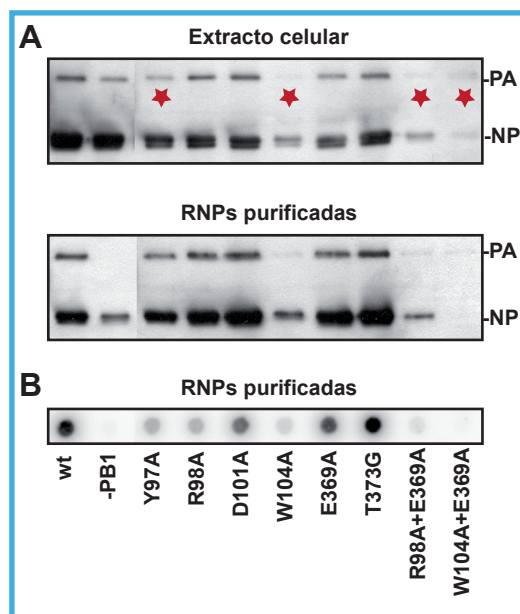


Figura R20. Fenotipo de las RNPs con los mutantes de NP en el sitio de interacción NP-polimerasa. A) Se reconstituyeron RNPs *in vivo* usando NP silvestre o mutante, y se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de Ni²⁺-NTA-agarosa. La acumulación de PA y NP se determinó mediante WB con anticuerpos específicos, tanto en los extractos celulares como en las preparaciones purificadas. La posición de PA y NP se indica a la derecha de la figura. B) Determinación de la concentración de RNPs purificadas por transcripción *in vitro*.

resultados fueron consistentes con la deficiencia de replicación observada para dichos mutantes. Sin embargo, al reconstituir las RNPs con dichos mutantes se observó una bajaba en la expresión de la polimerasa, por lo que no fue posible continuar con estos experimentos (Fig. R20A, estrellas rojas).

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN DE LA RNP DEL VIRUS DE LA GRIPE

1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

En esta Tesis Doctoral se ha presentado la estructura de la RNP recombinante generada por autorreplicación *in vivo*. Se trata por tanto de la estructura de una RNP progenie, similar a las que son encapsidadas en virus. Sin embargo nada se conoce acerca del cambio que debe de producirse en la polimerasa y/o en la RNP para pasar a una RNP transcripcionalmente activa. Así pues nos planteamos abordar el estudio estructural de la RNP durante el proceso de transcripción. Previamente se generaron RNPs recombinantes y se purificaron mediante cromatografía de afinidad, de modo que estas RNPs purificadas se utilizaron como enzimas en los diferentes ensayos.

Uno de los puntos determinantes más restrictivos en el estudio de especímenes por microscopía y procesamiento de imágenes es la homogeneidad de la muestra. Se decidió realizar una síntesis en condiciones limitantes para que el máximo número de RNPs activadas se detuviera en el mismo punto de la transcripción y poder realizar así medias bidimensionales. Además se podría detener la síntesis en diferentes puntos y estudiar distintos estadios de la transcripción. Se llevó a cabo una transcripción

in vitro con concentraciones decrecientes de UTP (10, 1, 0.1, 0.01 μ M) y un nucleótido marcado radiactivamente, se aisló el RNA y se comprobó el tamaño de los transcritos mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida y autorradiografía. Como control positivo se realizó en mismo ensayo con la concentración estándar de UTP, 100 μ M, y como control negativo se utilizaron RNPs reconstituidas sin RNA, y se realizó el ensayo con 100 μ M UTP. Los resultados mostraron que conforme se disminuía la concentración del nucleótido limitante la longitud de los RNAs transcritos se acortaba (Fig. R21). Para que las RNPs transcriban *in vitro* requieren un iniciador y nucleósidos trifosfato. Así pues, se diseñó una estrategia para activar, detener y purificar las RNPs activadas durante la transcripción que consistía en la modificación química de estos elementos para llevar a cabo dichas funciones. Se modificó el iniciador artificial ApG, añadiéndole una etiqueta de biotina con el objetivo de purificar las RNPs

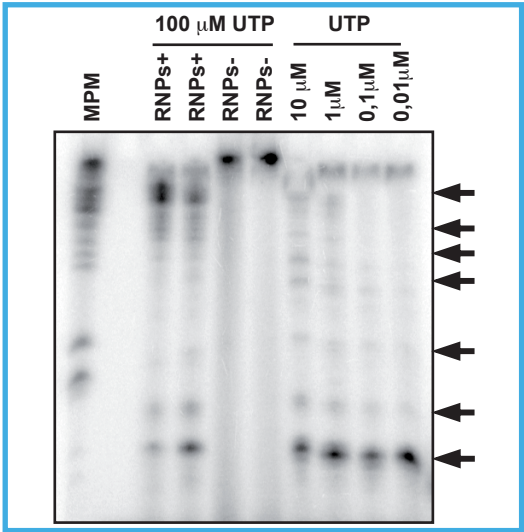


Figura R21. Síntesis de RNA en condiciones limitantes. Se reconstituyeron RNPs y se purificaron por cromatografía de afinidad. Las RNPs purificadas se utilizaron como enzimas para diferentes ensayos de transcripción *in vitro* con cantidades decrecientes de UTP (0.01, 0.1, 1 y 10 μ M). RNPs+, control positivo de transcripción con 100 μ M UTP; RNPs-, control negativo de transcripción; RNPs reconstituidas sin RNA y 100 μ M UTP. A la derecha se indican con flechas los RNA sintetizados.

activadas mediante una cromatografía de afinidad con resina de streptavidina-agarosa. Al mismo tiempo, se sustituyó el UTP por 4-thio-UTP, un análogo del UTP que en presencia de luz UV forma un *crosslinking* entre el RNA modificado y las proteínas cercanas (Testa et al, 1999). De esta forma se pretendía detener la síntesis, con una concentración limitante de dicho nucleótido, y estabilizar la estructura mediante el *crosslinking*, evitando que la polimerasa o el RNA se soltaran de la estructura objeto de estudio. En primer lugar, se probó si la polimerasa de gripe era capaz de transcribir con estos análogos. Para ello se llevó a cabo un ensayo de transcripción *in vitro* estándar con RNPs purificadas (ver **Materiales y Métodos**) en el que se utilizó como iniciador ApG o biotina-ApG en un caso, y UTP o 4-thio-UTP en otro caso. Los resultados mostraron que la polimerasa de gripe era capaz de incorporar ambos análogos (Fig. 22A y B).

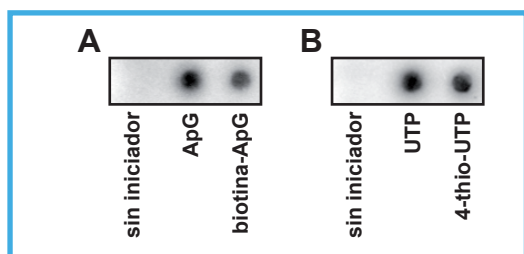


Figura R22. Síntesis de RNA con los análogos de ApG y UTP. Se comprobó que la polimerasa de gripe fuera capaz de transcribir con A) el análogo de ApG, biotina-ApG, y B) el análogo de UTP, 4-thio-UTP, mediante sendos ensayos de transcripción *in vitro* con dichos elementos.

Se realizó entonces un ensayo de transcripción *in vitro* con RNPs purificadas en el que se sustituyó el UTP por 4-thio-UTP. La transcripción se llevó a cabo en presencia o no de luz UV, de longitud de onda de 365 nm. Tras la reacción, tanto la muestra irradiada como la no irradiada (control negativo), se filtraron en una columna de Sephacryl S-300. La cantidad de isótopo radiactivo incorporado en el RNA y presente

en cada una de las fracciones se midió en un contador de centelleo. La cuantificación no mostró diferencias de movilidad en la columna de la muestra irradiada con respecto a la no irradiada, indicando que el RNA permanecía unido a la RNP. Se extrajo el RNA de las fracciones en las que se había detectado mayor cantidad de isótopo radiactivo y se analizó su tamaño por electroforesis desnaturalizante en geles de poli(acrilamida-urea) y autorradiografía. Los resultados mostraron que tanto en la muestra irradiada como en la no irradiada, se detectaba una banda definida de unos 220 nt y otra más difusa de mayor tamaño, correspondientes al RNA sintetizado no poliadenilado y al poliadenilado respectivamente (datos no mostrados), sugiriendo que el *crosslinking* no había funcionado. Sin embargo, a pesar de que la muestra irradiada mostró un patrón de bandas igual que el control negativo, este era de menor intensidad, lo que podría indicar que la irradiación afectó de alguna manera a las RNPs impidiendo la síntesis de RNA. En cualquier caso, el RNA de nueva síntesis permanecía unido a la RNP tras la filtración. Por otro lado, se realizó un ensayo de transcripción *in vitro* estándar con RNPs purificadas, en presencia de biotina-ApG o ApG (control negativo), se extrajo el RNA y se purificó por cromatografía de afinidad con resina de streptavidina-agarosa. Mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poli(acrilamida-urea) se analizaron alícuotas de cada punto de la purificación (input, lavados, eluidos y resina). Se comprobó que el RNA sin biotina se unía inespecíficamente a la resina, pero se eliminaba en los sucesivos lavados, mientras que el RNA con biotina era retenido y posteriormente eluido (datos no mostrados). Por tanto, se llevó a cabo una nueva transcripción *in vitro* con RNPs purificadas en la que se incluyeron los siguientes puntos: un control positivo de síntesis pero negativo de purificación (ApG y 1mM UTP), un control de síntesis limitante y negativo de purificación (ApG y 1 μM UTP), y por ultimo, un control de síntesis limitante y positivo

de purificación (biotina-ApG y 1 μ M UTP). Tras la síntesis, las RNPs se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de streptavidina-agarosa y se analizó la purificación mediante WB con anticuerpos específicos contra la polimerasa y la nucleoproteína. Los resultados mostraron que tanto las RNPs que habían sintetizado RNA con biotina como las que habían sintetizado RNA sin biotina, se unían a la resina y se eluían después, indicando que la polimerasa de la RNP debía unirse inespecíficamente a la resina.

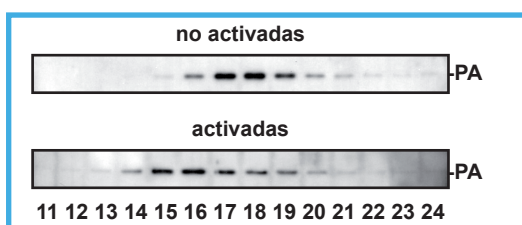


Figura R23. Filtración molecular de complejos activados.

Se reconstituyeron RNPs recombinantes y se purificaron por cromatografía de afinidad y filtración molecular. Las RNPs purificadas se activaron por transcripción *in vitro* y se fraccionaron de nuevo por filtración molecular en una columna de Sephacryl S-400. Como control negativo se utilizaron RNPs purificadas que no se activaron transcripcionalmente. Las fracciones se analizaron mediante geles de poliacrilamida-SDS y WB con anticuerpos anti-PA. RNPs activadas, RNPs no activadas.

Ante los malos resultados del *crosslinking* y la purificación con resina de streptavidina-agarosa, se decidió utilizar una estrategia mas sencilla, diferenciar las RNPs activadas por tamaño y/o movilidad. Para ello se activaron RNPs, previamente purificadas por cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} -NTA-agarosa y filtración molecular, mediante un ensayo de transcripción *in vitro*, es decir en presencia de iniciador ApG y nucleósido trifosfatos, y se fraccionaron de nuevo por filtración molecular. Como control negativo se utilizaron RNPs purificadas de la misma manera pero no se activaron. Los resultados mostraron un desplazamiento de las RNPs activadas con

respecto a las no activadas hacia tamaños más grandes, que se comprobó en varias ocasiones (Fig. R23). Este cambio de movilidad podría reflejar desde un cambio conformacional, que disminuyera el tiempo de migración a través de la cama, a la presencia de RNA de nueva síntesis y/o la presencia de otra polimerasa que realizara la síntesis *en trans*, aumentando el tamaño del complejo. Se prepararon rejillas de ambas muestras para analizar diferencias estructurales entre las RNPs activadas y las no activadas, y entre las RNPs activadas presentes en diferentes fracciones. Por observación directa en el microscopio, fue imposible atisbar alguna diferencia, por lo que el estudio requería un procesamiento informático de las imágenes. Se llevó a cabo el mismo experimento a gran escala para aumentar la concentración de la muestra, pero a pesar de los esfuerzos por obtener gran cantidad de RNPs activadas, no se pudo realizar el estudio estructural debido a la escasez y poca homogeneidad de la muestra.

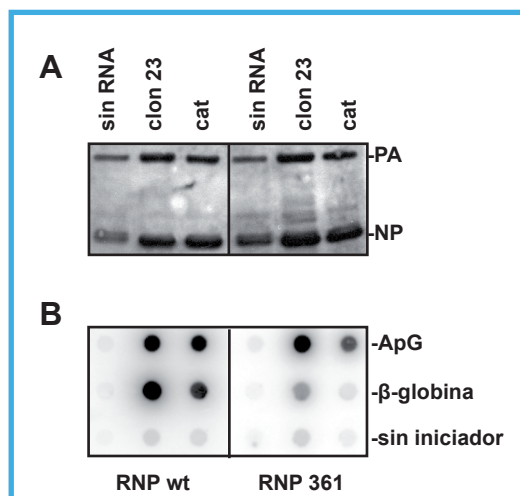


Figura R24. Generación de RNPs genéticamente diferenciables.

Se reconstituyeron *in vivo* 2 tipos de RNPs genéticamente diferenciables, una con el replicón viral de *cat* y la otra con el replicón clon 23. Como control se reconstituyeron RNPs sin RNA. Se sustituyó la subunidad PB2 por PB2HIS silvestre y por el mutante PB2HIS E361A. Las RNPs reconstituidas se purificaron por cromatografía de afinidad. A) WB anti-PA y anti-NP de las RNPs purificadas. B) Transcripción *in vitro* de las mismas RNPs purificadas con ApG, iniciador independiente de cap; mRNA de β-globina, iniciador dependiente de cap, y sin iniciador.

2. ANÁLISIS GENÉTICO DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

A raíz de los resultados que se obtuvieron en el análisis estructural del proceso de transcripción, nos cuestionamos el proceso en si mismo. Si el desplazamiento que se observó en la filtración molecular fuera debido a un aumento en el tamaño de los complejos activados, podría sugerir que la transcripción fuera llevada a cabo por una polimerasa libre o por otra RNP, es decir que la polimerasa de una RNP no transcribiera esa misma RNP. Se ha demostrado que las vRNPs pueden transcribir

mRNA en ausencia de nuevas proteínas virales, lo que se denomina transcripción primaria (Lamb & Choppin, 1976; Scholtissek & Rott, 1970), y que las RNPs recombinantes altamente purificadas pueden transcribir *in vitro* (Martín-Benito et al, 2001) (Fig. 2B). Con estos datos nos planteamos analizar genéticamente los procesos de replicación y transcripción. N. Jorba en el laboratorio determinó que una RNP paterna puede ser replicada en *trans* por una polimerasa soluble independiente y que una polimerasa diferente de la enzima replicativa puede acomplejar los RNA virales para dar lugar a las vRNPs progenie, estableciendo así

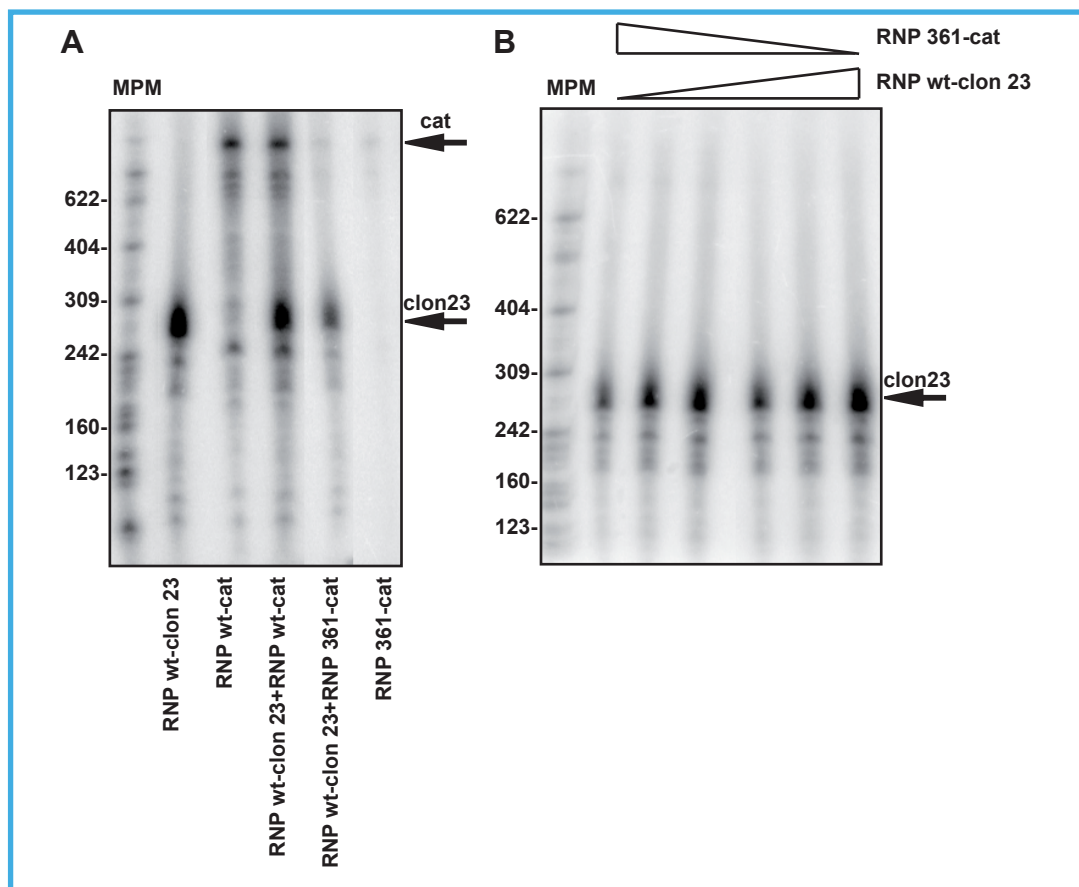


Figura R25. Ensayos de transcripción *in vitro* cruzados. Se reconstituyeron *in vivo* 3 tipos de RNPs-HIS: RNPs con PB2HIS silvestre y el replicón clon 23, RNPs con PB2HIS silvestre y el replicón viral de *cat*, y RNPs con PB2HIS E361A y el replicón viral de *cat*. A) Se utilizaron RNPs *cat* silvestres o RNPs *cat* E361A purificadas en transcripción *in vitro* individualmente o en combinación con RNPs clon 23 silvestres purificadas. Los productos de transcripción se purificaron y se analizaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y autorradiografía. B) El mismo ensayo realizado con cantidades crecientes de RNPs clon 23 silvestres y cantidades decrecientes de RNPs *cat* E361A. A la derecha de cada panel se indica la movilidad de transcritos de la RNPs clon 23 y *cat*. PM, pesos moleculares aproximados.

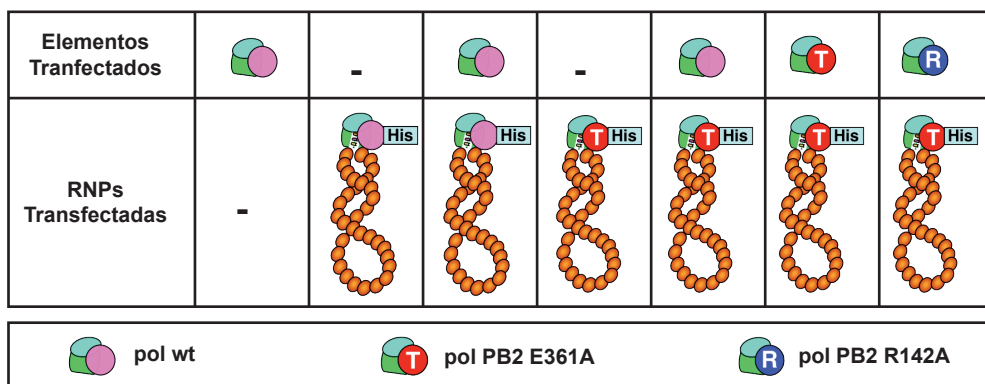


Figure R26. Diagrama de transfección. Células HEK 293T se transfectaron con RNPs *cat* silvestres o RNPs *cat* E361A purificadas. En algunos casos se transfectaron previamente plásmidos que expresan diferentes combinaciones de la polimerasa (con PB2 silvestre, PB2 E361A y PB2 R142A) como indica el diagrama.

un nuevo modelo de replicación para el virus de la gripe (Jorba et al, 2009). De hecho en las micrografías de RNPs preparadas para realizar las sesiones Crio-ME era frecuente encontrar complejos RNP-polimerasa, es decir anillos de NP con 2 polimerasas.

Con estos resultados y los resultados de la filtración de RNPs activadas nos preguntamos si la transcripción tendría lugar de la misma forma, es decir, en *trans*. Se reconstituyeron *in vivo* 2 tipos de RNPs genéticamente diferentes (ver [Materiales y Métodos, Manipulación de cultivos celulares 1.2](#)), una con el replicón viral de *cat* (720 nt) y la otra con el replicón del clon 23 (248 nt) (Martín-Benito et al, 2001; Ortega et al, 2000). Ambas contenían la etiqueta de histidinas en la subunidad PB2 para poder purificarlas mediante cromatografía de afinidad con resina de Ni²⁺-NTA-agarosa, pero se utilizaron 2 alelos distintos, el silvestre y el mutante E361A, que está afectado en transcripción en el reconocimiento de la estructura cap (Guilligay et al, 2008) (Fig. R24A). Estas RNPs purificadas se utilizaron por separado o combinadas en ensayos de transcripción *in vitro* usando como iniciadores ApG, que inicia la transcripción de manera independiente de cap, o el mRNA de β -globina,

que inicia la transcripción de manera cap-dependiente obligando a la polimerasa a robar el cap del mRNA de β -globina. Los resultados mostraron que las RNPs silvestres purificadas pueden transcribir tanto con ApG como con el mRNA de β -globina como iniciadores. Sin embargo, las RNPs que poseen la mutación E361 en PB2 transcriben perfectamente con ApG, pero son incapaces de hacerlo cuando utilizan como donador de cap el mRNA de β -globina

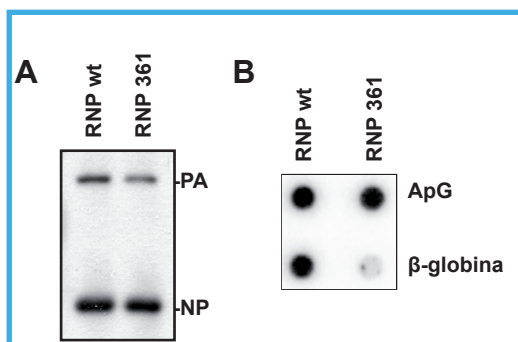


Figura R27. Caracterización de las RNPs *cat* purificadas. Se reconstituyeron RNPs con el replicón viral de *cat* y PB2-HIS silvestre o PB2-HIS E361A con el replicón viral de *cat* (361-*cat*) y se purificaron por cromatografía de afinidad. A) La acumulación de RNPs silvestres (Wt) o mutantes (361) se determinó por WB con anticuerpos anti-PA y anti-NP. B) El fenotipo de transcripción se determinó por transcripción *in vitro* usando ApG (ApG) o mRNA β -globina (β -globina) como iniciadores de la transcripción.

(Guilligay et al, 2008) (Fig. R24B). Así pues, con estos materiales biológicos se ensayó si la RNP silvestre-clon 23 podía rescatar la actividad transcripcional de la RNP mutante 361-*cat* en *trans*, ya que los RNAs producto son distinguibles por tamaño (248 nt frente a 720 nt). Se realizaron ensayos de transcripción *in vitro* con mezclas de ambas RNPs usando el mRNA de β -globina como donador de cap y los productos de transcripción se analizaron mediante geles desnaturalizantes de poli(acrilamida y autorradiografía. La RNP *cat* silvestre puede transcribir sola, o en presencia de la RNP clon 23 silvestre. La RNP *cat* mutante E361 sólo produce un fondo de transcripción, que no aumenta cuando se le añade la RNP clon 23 silvestre (Fig. R25A). Se realizó el mismo experimento con diferentes cantidades de RNPs clon 23 silvestre y RNPs *cat* mutante sin que se apreciara ninguna diferencia (Fig. R25B). Por tanto los resultados mostraron que, al menos *in vitro*, no hay transcripción en *trans*.

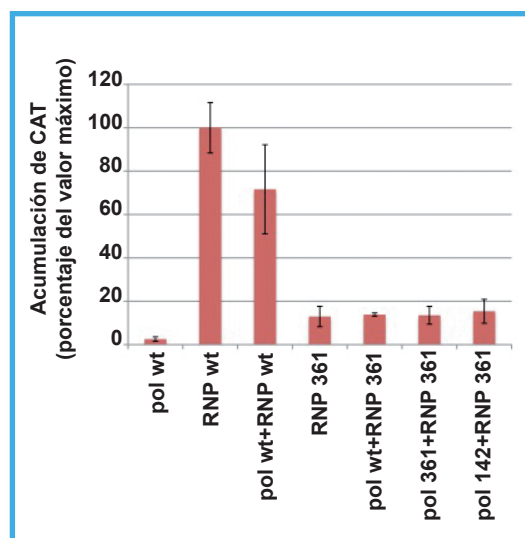


Figura R28. Ausencia de transcripción de RNPs por complejos de polimerasa soluble en *trans*. La cantidad de proteína CAT acumulada en las células transfectadas como se indica en el diagrama de la Fig. R26 se determinó por ELISA. Los datos se presentan como porcentaje del valor máximo, obtenido transfectando RNPs *cat* silvestres. Media y desviación estándar de 6 experimentos independientes. El 100% corresponde a 340 pg/ml de proteína CAT.

Aún existía la posibilidad de que durante la fase de transcripción secundaria una polimerasa soluble fuera capaz de transcribir las RNPs en *trans*. Para analizar esta posibilidad se generaron RNPs recombinantes *in vivo* con el replicón *cat*, se purificaron por cromatografía de afinidad y se transfectaron en células HEK 293T con el método del fosfato cálcico. Alternativamente se co-transfectaron RNPs *cat* purificadas, en células en las que previamente se habían transfectado los plásmidos que expresan las subunidades de la polimerasa (Fig. R26). Al no transfectar plásmido que exprese NP no puede haber replicación *in vivo* de las RNPs (de la Luna et al, 1993; Huang et al, 1990). De la misma manera que para el experimento anterior, se utilizaron 2 tipos de RNPs, las de fenotipo silvestre y las mutantes en transcripción (PB2 E361A). Se transfectaron 3 alelos diferentes de la subunidad PB2, generando polimerasa silvestre, polimerasa deficiente en transcripción E361A, o polimerasa deficiente en replicación R142A (Gastaminza et al, 2003). Se realizaron varias combinaciones de RNPs-polimerasa en los ensayos de co-transfección (Fig. R26) mimetizando la situación de transcripción primaria (transfección de RNPs purificadas únicamente) o transcripción secundaria (co-transfección de RNPs y los plásmidos de expresión de la polimerasa). Tras 24 horas post-transfección se recogieron las células y se determinó la acumulación de proteína CAT mediante un ensayo ELISA. Previamente se comprobó que las RNPs purificadas que se transfectaron eran biológicamente activas. Para ello se determinó su actividad mediante transcripción *in vitro*, comprobando que hubiera correlación entre la cantidad de RNPs determinada por WB y la capacidad de sintetizar RNA *in vitro* (Fig. R27A). Así mismo, se verificó que las RNPs mutantes contenían la mutación E361A, utilizando como iniciadores ApG y el mRNA de β -globina (Fig. R27B). Los resultados del experimento de co-transfección (Fig. R28) demostraron que la expresión de las subunidades de la polimerasa sola no producen

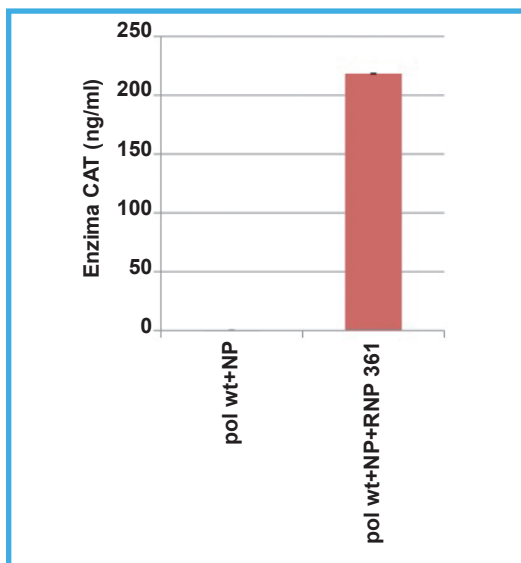
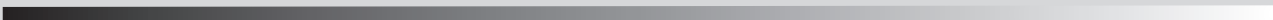
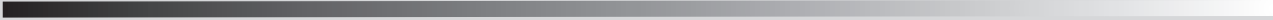


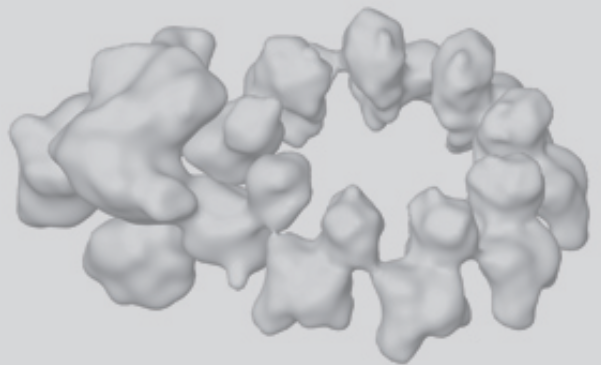
Figura R29. Actividad biológica *in vivo* de las RNPs 361 purificadas. Se comprobó que las RNPs purificadas y transfectadas sirven como molde para la transcripción y la replicación *in vivo* co-transfectando las subunidades que expresan la polimerasa y la NP, junto con dichas RNPs.

CAT, pero que la transfección de RNPs silvestres-*cat* produce cantidades medibles de CAT, aunque esta cantidad no se ve incrementada cuando se co-expresan las RNPs con la polimerasa silvestre. De acuerdo con el fenotipo deficiente en transcripción, las RNPs 361 producen menos cantidad de CAT y la expresión de polimerasa no es capaz de incrementar la expresión de CAT, independientemente de su fenotipo (Fig. R28). Se comprobó que las RNPs 361 purificadas eran activas tras la transfección con un ensayo en el que se co-transfectaron las subunidades que expresan la polimerasa y la NP (Fig. R29). Los resultados mostraron que las RNPs 361 pueden servir como molde para la transcripción y la replicación *in vivo*. Se comprobó también el posible arrastre de proteína CAT en las RNPs purificadas transfectando extractos celulares que contenían proteína CAT. La cantidad arrastrada resultó despreciable (10^{-3} - 10^{-4}), de manera que la proteína CAT generada por transfección de RNPs silvestres purificadas representa únicamente transcripción primaria. Por consiguiente, los resultados indican que, en

las condiciones experimentales empleadas, no hay *trans*-activación de la transcripción de RNPs *in vivo* por polimerasa soluble.



DISCUSIÓN



1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RNP DEL VIRUS DE LA GRIPE

1.1 LA ESTRUCTURA DE LA RNP

La unidad de replicación y transcripción del virus de la gripe es la ribonucleoproteína o RNP. Las RNPs son estructuras helicoidales que adoptan conformaciones superenrolladas. Estos macrocomplejos están formados por un segmento del RNA genómico, acompañado en sus extremos por la polimerasa viral y tapizado por varias moléculas de NP. Durante años se ha intentado estudiar la estructura y el funcionamiento de estos complejos ya que constituyen la maquinaria de autoperpetuación de los virus (Compans et al, 1972; Heggeness et al, 1982; Ortega et al, 2000). Sin embargo, el tamaño y la flexibilidad de las RNPs virales han ralentizado el avance de estos estudios. En nuestro laboratorio se describió el análisis estructural de RNPs reconstituidas *in vivo* a partir de proteínas recombinantes y un vRNA molde de 248 nt (Martín-Benito et al, 2001). En este caso las imágenes se obtuvieron por microscopía electrónica de muestras teñidas negativamente, pero la escasa concentración de la muestra impidió un estudio estructural más profundo.

Para solucionar este problema y poder llevar a cabo un estudio estructural más detallado, en esta Tesis se han realizado varias modificaciones tanto en la generación de las RNPs como en la purificación y en el estudio microscópico de las mismas. Así pues, en primer lugar se ha aumentado la cantidad de células de partida. Este aumento de células implica una mayor cantidad de RNPs, pero también mayor cantidad de contaminantes. Por tanto, se ha cambiado y optimizado el protocolo de purificación de

las RNPs para incrementar la concentración y la limpieza de la muestra. Por otro lado, se ha utilizado un microscopio electrónico más avanzado que permite alcanzar mayor resolución. Por último, las imágenes se han obtenido mediante criomicroscopía electrónica, una técnica que obtiene la información directamente de la partícula objeto de estudio, sin agentes de tinción.

El nuevo mapa tridimensional de la RNP recombinante del virus de la gripe es similar al anteriormente publicado (Martín-Benito et al, 2001), y se observa el anillo circular de 9 NP y el complejo de la polimerasa en un extremo (Fig. D1A). Sin embargo, la nueva estructura define los dominios de la NP y de las subunidades de la polimerasa, así como la unión entre los monómeros de NP (Fig. D1B). Además, se ha comprobado que la estructura publicada anteriormente estaba alargada. Esto es debido a la técnica empleada para la toma de imágenes, ya que las muestras teñidas tienen una caída preferencial sobre la rejilla que produce una pérdida de información, y como consecuencia el alargamiento de las estructuras en el eje Z (Fig. D1A). La técnica empleada en esta Tesis, la criomicroscopía electrónica o Crio-ME, permite la disposición aleatoria del espécimen en el espacio, con lo que se dispone prácticamente de todas las vistas posibles. En la nueva estructura se aprecia una disminución de la altura del anillo de NP, así como la desaparición de la unión entre los monómeros en la parte inferior del anillo (Fig. D1B), que podría haber sido ocasionada por la acumulación del agente de tinción. En la estructura presentada en esta Tesis también se aprecian las uniones entre monómeros de NP, pero estas protuberancias parten de algún lugar entre los dominios de la cabeza y el cuerpo (Fig. D1B). La estructura de la polimerasa, que en el modelo anterior se mostraba como una masa compacta, aparece aquí como un complejo de proteínas que interactúan entre sí, pero de un modo más distendido y en ningún caso formando

un plegamiento compacto. Se observan claramente 3 zonas diferenciadas que podrían corresponder a las 3 subunidades del complejo (Fig. R9). En el nuevo modelo estructural de la RNP se aprecian también las uniones del anillo con la polimerasa, subrayándose de nuevo la diferencia entre ambas uniones.

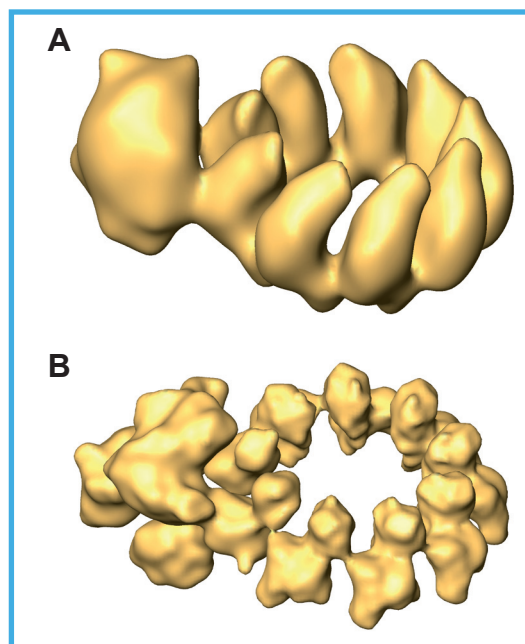


Figura D1. Estructura de la RNP del virus de la gripe. Comparación entre la estructura publicada por Martín-Benito et al. con una resolución de 27Å para el anillo de NP y 33 Å para el complejo de la polimerasa (Martín-Benito et al, 2001), y la estructura presentada en esta Tesis con una resolución de 12Å para el anillo de NP y 18 Å para el complejo de la polimerasa.

1.2 EL ANILLO DE NP

El aumento de la resolución y la publicación de la estructura atómica de la NP de gripe (Ye et al, 2006), han permitido la realización de un *docking* de ésta en el volumen de cada monómero de NP (Fig. D2). De esta manera hemos generado un mapa cuasi-atómico del anillo de NP, en el que el *docking* confirma la calidad de la estructura obtenida y permite elaborar hipótesis sobre la interacción entre los monómeros y la posición del RNA.

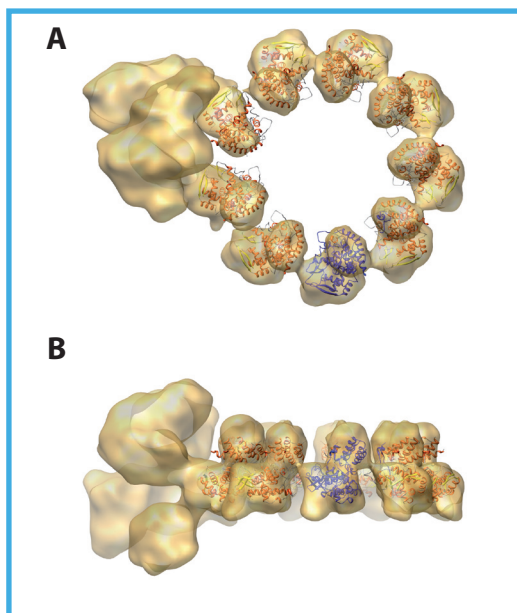


Figura D2. Docking de la estructura atómica de la NP en el anillo de la RNP. En la figura se muestra la estructura de la RNP en la que se ha realizado un *docking* de la estructura atómica de la NP (Ye et al, 2006) en cada uno de los monómeros de NP. Se observan las conexiones entre los monómeros adyacentes y las interacciones con la polimerasa. A) Vista frontal y B) Vista lateral.

La NP de gripe comparte analogía estructural con las demás NPs publicadas (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006; Luo et al, 2007; Rudolph et al, 2003), sin embargo existen varias diferencias entre ellas (Tabla D1). La más llamativa es que las RNPs de los Mononegavirales no son sensibles a RNAsas, pero las del virus de la gripe sí lo son. Las NPs de VSV (Green et al, 2006) y RABV (Albertini et al, 2006) han sido cristalizadas junto con el RNA. En estas estructuras el RNA recorre la parte interior del anillo por una hendidura situada entre los dominios de la cabeza y el cuerpo, de forma que el RNA se encuentra protegido y no expuesto (Tabla D1), por lo que las RNPs de estos virus no son sensibles a RNAsas. El *docking* de la estructura de la NP de gripe muestra que ésta se dispone de forma opuesta en el anillo de la RNP, es decir, con la hendidura de aminoácidos básicos hacia el exterior, de manera que el RNA quedaría expuesto y de hecho es susceptible de degradación por RNAsas y/o modificación por agentes químicos como se ha demostrado

(Baudin et al, 1994).

La zona de interacción NP-NP se había localizado en el lazo que comprende los aminoácidos 420-428 (Ye et al, 2006). En esta Tesis se ha llevado a cabo un estudio funcional de este lazo. Los residuos F412 y R416 son esenciales para la replicación de las RNPs, como se observa en la Figura R16. Sin embargo, el residuo K422 no parece ser importante para la replicación ni parece estar involucrado en la interacción entre monómeros a pesar de estar conservado entre las cepas A y B del virus de la gripe (Fig. R16 A y B). El residuo R416 había sido previamente descrito como importante para la oligomerización de la NP (Elton et al, 1999a; Ye et al, 2006). El aminoácido F412 se manifiesta también como relevante en la interacción entre monómeros, ya que mutaciones en dicha posición afectan la actividad transcripcional de

las RNPs reconstituidas con el mutante F412A (Fig. R16B). De hecho, estos dos residuos habían sido descritos anteriormente como importantes para la interacción NP-RNA (Elton et al, 1999b). Sin embargo, los resultados aquí mostrados sugieren que la incapacidad de oligomerizar, asociada a los mutantes R416A y F412A, es lo que afecta la interacción con el RNA. Se ha descrito que la interacción NP-RNA es cooperativa (Yamanaka et al, 1990), por lo que podría ocurrir que la ausencia de oligomerización de la NP imposibilitara la unión del RNA a varias moléculas de NP al mismo tiempo, disminuyendo la avidez por el RNA.

Por otra parte, en la estructura obtenida se observa que la polimerasa establece dos puntos de contacto de distinta intensidad con las dos NPs adyacentes (Fig. R7B). Según datos bioquímicos (Biswas et al, 1998) y estructurales


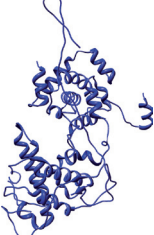
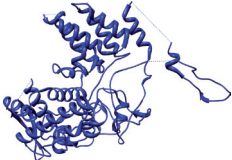
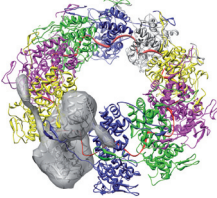
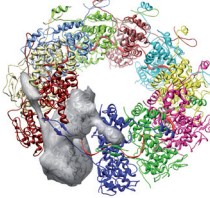
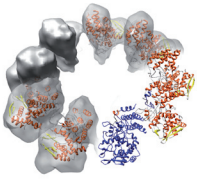
Virus	VSV	Rabia	Gripe
Peso Molecular	47.5	50.5	56.2
nº aminoacidos	422	450	498
contactos/NP (cristal)	2	2	1
Protección a nucleasas	si	si	no
Estructura atómica			
Estructura de la RNP			

Tabla D1. Estructura de la NP de VSV, Rabia y Gripe. Comparación entre las tres NP. Se muestran las estructuras atómicas de la NP de VSV (Green et al, 2006), RAVB (Albertini et al, 2006) y gripe (Ye et al, 2006), así como las estructuras de sus correspondientes RNPs.

(Area et al, 2004) anteriores, la interacción de mayor intensidad representaría el contacto entre la subunidad PB1 y NP, mientras que la que parece mas débil podría representar el contacto entre la subunidad PB2 y NP. Biswas y Nayak, habían demostrado que la interacción NP-PB2 estaba mediada por tres regiones distintas de NP (Biswas et al, 1998) y se había observado que mutantes de NP, defectivos en la síntesis de vRNA, recuperaban su actividad por mutaciones compensatorias en PB2 (Mandler et al, 1991). En esta línea, recientemente se ha demostrado, que mutaciones en NP que afectan a la interacción NP-PB2 son compensadas por un cambio E627 a K627. Esta posición está implicada en la determinación de rango de hospedador (Gabriel et al, 2005; Gabriel et al, 2008; Mehle & Doudna, 2008; Resa-Infante et al, 2008) y parece que además modula la eficacia de unión NP-polimerasa en células humanas durante la infección (Labadie et al, 2007; Rameix-Welti et al, 2009). Gracias al *docking*, se pudo hacer una predicción de los aminoácidos implicados en la interacción NP-

polimerasa. Sin embargo, por razones que no hemos podido esclarecer, la expresión de los diferentes mutantes que afectaban a las zonas potencialmente implicadas en la interacción con la polimerasa, inhibía la síntesis de las demás proteínas de la RNP que se expresaban con ellos. Las mutaciones propuestas podrían indicar un mal plegamiento de la NP y, como resultado, las RNPs no replican. Sin embargo, el problema es anterior, las RNPs no replican porque no se expresan sus elementos y por tanto no se forman los complejos. Desconocemos la razón por la cual una mutación en NP podría afectar a la expresión de cualquier subunidad de la polimerasa, si bien es cierto que no hemos comprobado si afecta sólo a la expresión de las proteínas virales o si afecta a cualquier proteína que se exprese junto con los mutantes. Para el análisis de la interacción NP-polimerasa será necesario diseñar nuevos mutantes que no afecten a la expresión de otras proteínas.

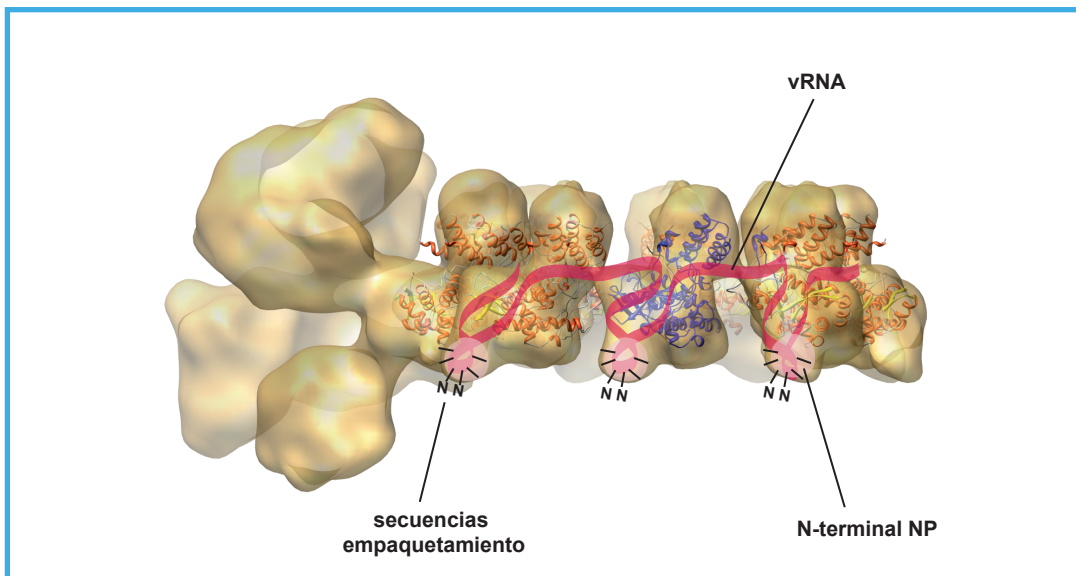


Figura D3. Localización del RNA. En la figura se muestra la estructura de la RNP en la que se ha realizado un *docking* de la estructura atómica de la NP (Ye et al, 2006) en cada uno de los monómeros de NP. Sobre la estructura se ha dibujado el posible trazo que podría seguir el RNA. La masa extra de la parte inferior de la NP queda ahora ocupada por parte del RNA y el N-terminal de la NP. Se muestran las posibles secuencias de empaquetamiento expuestas para permitir su interacción con otras RNPs durante el empaquetamiento.

1.3 LA POSICIÓN DEL RNA

En los Mononegavirales, cada molécula de NP tiene asociados 9 nt que cubren la distancia justa de un extremo a otro de la molécula (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006) (Tabla D1). Sin embargo en el virus de la gripe se ha estimado una media de 24 nt por monómero de NP (Ortega et al, 2000). Se ha observado que, a pesar de que las RNPs del virus de la gripe son sensibles a RNAsas, la mayor parte del RNA se encuentra protegido (Fig. R13). La estructura de la RNP presentada en esta Tesis muestra la hendidura situada entre los dominios de la cabeza y el cuerpo, en la cual se ha propuesto el sitio de interacción con el RNA (Ye et al, 2006). Sin embargo, la longitud del RNA por monómero de NP es excesiva para una unión lineal en dicha hendidura, tal y como ocurre en los Mononegavirales. Además, la NP de gripe posee grupos de aminoácidos básicos distribuidos por toda su superficie, sugiriendo que el RNA podría recorrer cualquier parte de dicha superficie y no sólo la hendidura propuesta. De hecho, la región N-terminal de NP ha sido implicada en la unión con el RNA mediante ensayos bioquímicos (Albo et al, 1995). Esta región no está representada en la estructura atómica de la proteína (Ye et al, 2006), pero por analogía estructural con otras NPs estaría situada en el extremo inferior de la molécula (Rudolph et al, 2003). En esta Tesis se propone que tanto la región del N-terminal de NP como parte del RNA podrían dar cuenta de la masa extra localizada en la parte inferior de la RNP (Fig. D3). Así pues, el RNA recorrería parte de la hendidura propuesta, descendería por el cuerpo de la NP, en la parte más inferior el RNA giraría para ascender de nuevo por el cuerpo de la NP, dejando 5 o 6 nt expuestos y desprotegidos, como muestra el gel de la Figura R13 (Fig. D3). Otra diferencia entre los Mononegavirales y el virus de la gripe es que, como su propio nombre indica, éstos virus deben empaquetar un único segmento. Sin embargo, para que un virus de la gripe sea infeccioso debe contener ocho RNPs

diferentes (Smith & Hay, 1982), por tanto estas RNPs deben reconocerse entre si (Fujii et al, 2005; Fujii et al, 2003; Liang et al, 2005; Liang et al, 2008; Muramoto et al, 2006; Noton et al, 2007; Ozawa et al, 2009; Watanabe et al, 2003). De manera que se podría proponer que estos 5 o 6 nt podrían contener las secuencias de empaquetamiento que deben estar expuestas para que puedan reconocerse unas RNPs con otras.

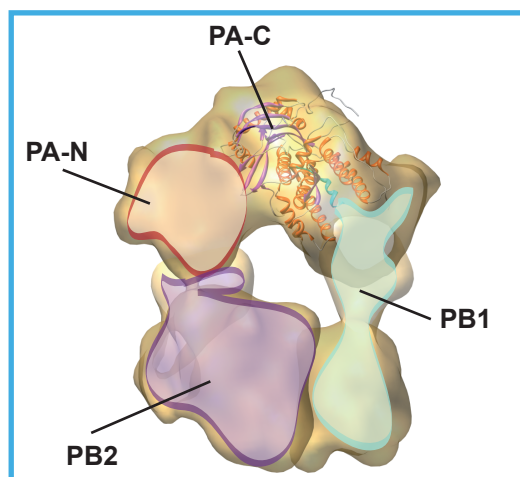


Figura D4. Modelo del complejo de la polimerasa. Se muestra la disposición de las subunidades de la polimerasa. Una vez inferidas y corregidas las posiciones de las subunidades de la estructura previamente publicada (Area et al, 2004), y realizado el docking del dominio PA (C) –PB1 (N) (He et al, 2008) en el volumen de la nueva estructura del complejo de la polimerasa, proponemos que las subunidades se dispongan en círculo alrededor de lo que podría ser el túnel de RNA, como se observa en la figura.

1.4 ESTRUCTURA DE LA POLIMERASA Y LOCALIZACIÓN DE DOMINIOS EN LAS SUBUNIDADES

La estructura de la polimerasa del virus de la gripe a 18 Å de resolución, muestra que se trata de un complejo poco compacto con un volumen compatible con sus 250 kDa de masa molecular. En esta estructura se observan tres dominios que podrían corresponder a las tres subunidades

PA, PB1 y PB2. Area et al., localizaron diferentes dominios de las subunidades mediante etiquetas y anticuerpos específicos contra cada una de las subunidades (Area et al, 2004), sin embargo, el *docking* de la estructura atómica de la NP en el mapa tridimensional de la RNP ha determinado que la RNP y por tanto la polimerasa anteriormente publicadas (Area et al, 2004; Martín-Benito et al, 2001), tienen la mano cambiada, es decir que la estructura correcta es su imagen especular (Fig. R9A). Por lo que hemos inferido la posición de estos dominios, una vez corregidos, en el nuevo mapa de la polimerasa (Fig. R9). Recientemente se han publicado las estructuras atómicas de diferentes dominios de las subunidades de la polimerasa (Dias et al, 2009; Guilligay et al, 2008; Guu et al, 2008; He et al, 2008; Tarendeau et al, 2007; Tarendeau et al, 2008; Yuan et al, 2009), con los que hemos realizado un *docking* para obtener un mapa cuasi-atómico. Desgraciadamente sólo ha sido posible encajar uno de los dominios, PA (C)-PB1 (N) (He et al, 2008), ya que el resto eran demasiado pequeños y poco conspicuos. Esta localización del dominio concuerda con la localización de las subunidades del trabajo de Area et al. (Area et al, 2004) (Fig. R9). A pesar de no haber podido realizar los demás *docking*, proponemos la siguiente distribución: la subunidad PB1 ocuparía una pequeña región de la parte superior de la polimerasa, donde hemos situado el N-terminal de PB1, y descendería ocupando el lóbulo inferior derecho, de forma que interacciona con NP (Fig. D4). El dominio N-terminal de PA se localizaría a continuación del dominio C-terminal de PA, en la parte superior de la polimerasa, sin interaccionar ninguno de los dos con NP (Fig. D4). La subunidad PB2 se situaría en el lóbulo inferior izquierdo, interaccionando fuertemente con NP (Fig. D4). La reciente interacción PA-PB2 (Hemerka et al, 2009) que se sospechaba desde hace tiempo concuerda con la localización de ambas subunidades que proponemos. No se puede descartar que algún dominio de PB2 también se situara junto con PB1 en el lóbulo

inferior derecho (Fig. D4). También se aprecian perfectamente los contactos subunidad-subunidad que se han descrito bioquímicamente, en los que PB1 se une a PA y a PB2 (Biswas & Nayak, 1994; González et al, 1996). De esta forma las tres subunidades están en estrecho contacto para llevar a cabo las funciones de replicación y transcripción. El extremo 5' del vRNA debe de estar unido al C-terminal PB1, que se encontraría situado en el lóbulo derecho, y éste a su vez es responsable de la interacción con el N-terminal de PB2, que estaría localizado en el otro lóbulo. De hecho la disposición en círculo que proponemos facilitaría el contacto de todas las subunidades con el RNA, sugiriendo que el espacio central que queda entre ellas pudiera ser la hendidura del RNA. La interacción PA-PB2 facilitaría la unión y el corte de las estructuras *cap* de los mRNAs celulares, ya que son estas dos subunidades las encargadas de ambas funciones (Blaas et al, 1982; Dias et al, 2009; Fechter et al, 2003; Guilligay et al, 2008; Honda et al, 1999; Li et al, 2001; Ulmanen et al, 1983; Yuan et al, 2009). En cualquier caso, para saber la localización exacta de las subunidades y como interaccionan entre ellas, habrá que esperar a la cristalización completa de la polimerasa o a la resolución de dominios más conspicuos y de mayor tamaño que permitan su inserción en el mapa de Crio-ME de la polimerasa.

1.5 RESUMEN FINAL DE LA ESTRUCTURA DE LA RNP

La nueva estructura obtenida para la RNP recombinante del virus de la gripe nos acerca un poco más al conocimiento de este virus. Esta estructura tiene una enorme relevancia: A pesar de no haber alcanzado la resolución atómica, es la única estructura resuelta de una RNP biológicamente activa. Es cierto que la estructura es de una mini-RNP recombinante y no de una RNP viral completa, pero la partícula en general podría considerarse el principio y el final de una RNP viral, es decir, el complejo de

la polimerasa unido al *panhandle* y el lazo del extremo final, como si hubiéramos eliminado la parte superenrollada de la RNP (Fig. D5).

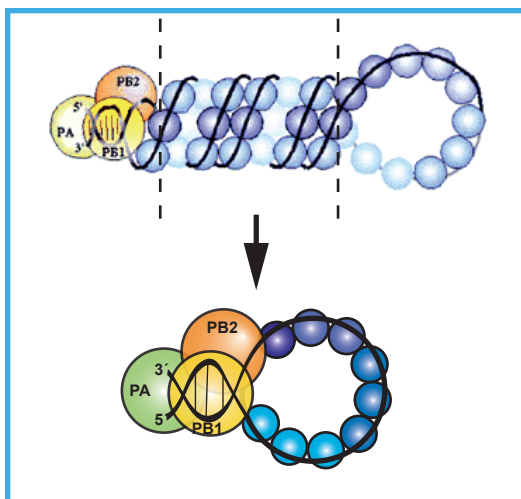


Figura D5. Representación esquemática de una mini-RNP.

El anillo de NP, con una resolución de 12 Å, permite comparar la RNP de gripe con las RNPs de los Mononegavirales. El RNA en los complejos NP-RNA de VSV y RABV se encuentra situado en el interior del anillo, completamente protegido (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006). Sin embargo, en la RNP de gripe, éste se encuentra probablemente expuesto en el exterior, y sólo parcialmente protegido. Esta diferencia podría deberse a la diferente localización celular de estos virus. Mientras que los Mononegavirales tienen un ciclo celular citoplasmático, el de gripe es nuclear. Las RNPs de los Mononegavirales deben estar mejor protegidas para sobrevivir en un medio mucho más agresivo para el RNA como es el citoplasma. También se ha postulado que la accesibilidad del RNA en la RNP de gripe permite la síntesis de RNA sin necesidad de que las RNPs se desensamblen. Este es un punto crítico, y poco conocido, tanto de la replicación como la transcripción del virus de la gripe. En estos modelos cabe la posibilidad de que el RNA pueda desacoplarse de la NP, por lo que la polimerasa

se comportaría de una manera similar a la del resto de los virus, aunque se desconoce como podría llevarse a cabo dicho desensamblaje. Si por el contrario es el conjunto NP-RNA el que actúa de molde, implicaría que la polimerasa del virus de la gripe hubiese desarrollado un mecanismo distinto al de otras polimerasas, que permitiera al complejo de la polimerasa exponer el centro catalítico al RNA dispuesto sobre la NP. Por el momento no existen datos bioquímicos que apoyen ninguna de las dos hipótesis.

2. NUEVO MODELO DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL

2.1 ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN

La polimerasa del virus es responsable tanto de la replicación como de la transcripción del RNA genómico. No se conoce el mecanismo de transición entre ambos procesos pero se cree que un mecanismo de intercambio regula el paso de un proceso al otro. Tampoco se conocía hasta hace muy poco si la síntesis viral era llevada a cabo por la polimerasa que forma parte de la RNP o bien por otra soluble. Para abordar estas cuestiones se intentó obtener la estructura de la RNP durante el proceso de transcripción. Sin embargo la escasa concentración de RNPs purificadas y activadas impidió realizar el estudio microscópico. Se decidió entonces estudiar genéticamente la transcripción viral.

2.2 ¿PUEDE UNA RNP SILVESTRE COMPLEMENTAR A OTRA RNP DEFECTIVA EN TRANSCRIPCIÓN?

Gracias a que se disponía de un sistema recombinante de replicación y transcripción, y de mutantes de la polimerasa bien caracterizados, nos preguntamos cómo se llevaba a cabo el mecanismo de transcripción viral. En un

proyecto en colaboración con P. Resa-Infante, se habían generado mutantes en PB2 que tenían alterada la capacidad de unión a estructuras *cap* y por tanto transcribían de manera ineficiente, mientras que podían replicar normalmente (Guilligay et al, 2008).

Para contestar a la pregunta de si las RNPs pueden transcribir en *trans*, se reconstituyeron RNPs recombinantes con la subunidad PB2 mutante en transcripción, que tenían la función de replicación intacta, o bien su homólogo silvestre (Fig. R24). Se utilizaron mutantes en transcripción para poder distinguir fenotípicamente ambas poblaciones de RNPs. Además se utilizaron vRNAs molde de distinto tamaño para poder distinguir los productos de transcripción tras el ensayo de complementación. Como se muestra en la Figura R25, no se observó ningún fenómeno de complementación intragénica ya que la RNP silvestre no era capaz de rescatar la actividad de la RNP deficiente en transcripción.

Estos ensayos reflejan el estado de transcripción primaria, en el que no hay presencia de otras proteínas virales y son las propias RNPs las deben llevar a cabo su función de manera autónoma. La transcripción en *cis* posee la ventaja de la independencia, puesto que cada segmento se transcribe de forma independiente de los demás, al menos durante la transcripción primaria. Además, la transcripción en *cis* simplifica el contenido del virión, ya que no necesita empaquetar otra polimerasa adicional que inicie la síntesis.

2.3 ¿ PUEDE UNA POLIMERASA SOLUBLE INCREMENTAR LA TRANSCRIPCIÓN DE UNA RNP?

Este proyecto se llevó a cabo en colaboración con N. Jorba en el laboratorio y dió como resultado un nuevo modelo de replicación y transcripción para el virus de la gripe. Gracias a

que se disponía de un sistema recombinante de replicación y transcripción, y de mutantes de la polimerasa bien caracterizados, nos hicimos varias preguntas acerca del mecanismo de replicación y transcripción viral. Dado que la polimerasa del virus es un complejo heterotrimérico, los mutantes analizados debían de estar todos en la misma subunidad. Se disponía de mutantes en la subunidad PB2 que afectaban únicamente a uno de los dos procesos: replicación o transcripción. P. Gastaminza en el laboratorio, describió unos mutantes de PB2 que no eran capaces de replicar correctamente, sin embargo transcribían de modo normal (Gastaminza et al, 2003). Por otro lado, se disponía de los mutantes en PB2 que tenían alterada la capacidad de unión a estructuras *cap* y por tanto transcribían de manera ineficiente, mientras que podían replicar normalmente (Guilligay et al, 2008). Estos mutantes nos permitieron realizar experimentos de complementación intragénica que dieron respuesta a las preguntas concretas que nos habíamos planteado.

Los resultados observados en la Figura R25 sugieren que la transcripción primaria de las RNPs ocurre en *cis*. Sin embargo durante la transcripción secundaria la presencia de proteínas, especialmente la polimerasa viral, podrían afectar la síntesis de mRNA viral. De hecho se ha comprobado que esta regulación es la responsable de la diferencia de síntesis de unos segmentos a otros. Además, N. Jorba en el laboratorio había determinado que la replicación del virus de la gripe ocurre en *trans*, es decir que es otra polimerasa diferente de la de RNP y soluble la que lleva a cabo dicho proceso. Así pues, nos planteamos un nuevo experimento *in vivo* para comprobar si una polimerasa soluble podía incrementar la transcripción de una RNP en *trans*. Para contestar esta pregunta se reconstituyeron RNPs recombinantes con la subunidad PB2 mutante en transcripción y su homólogo silvestre (Fig. R27). Estas RNPs se

purificaron y se transfectaron en células en las que previamente se habían expresado distintos tipos de polimerasa (Fig. R26). Como se muestra en la Figura R28 la transcripción de las RNPs silvestres, medida como acumulación de proteína CAT, no aumentó en presencia de polimerasa soluble, y la transcripción de las RNPs mutantes defectivas en transcripción no fue rescatada por ninguna polimerasa soluble. De modo que los resultados de la Figura 28 sugieren que la transcripción secundaria también ocurre en *cis*.

Este cambio de modalidad de síntesis, replicación en *trans* versus transcripción en *cis*, podría representar el cambio que lleva buscándose años para que la polimerasa pase de un estado a otro. De hecho está firmemente demostrado que la replicación requiere proteínas virales para que tenga lugar (Barrett et al, 1979), en concreto NP soluble que encapside el nuevo RNA sintetizado (Beaton & Krug, 1986; Shapiro & Krug, 1988). Además se ha observado que NP aumenta la procesividad de la polimerasa durante la replicación (Honda et al, 1988) y resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación, proceso que los autores llamaron antiterminación (Beaton & Krug, 1986).

En contraste con la complementación observada en los procesos de replicación, no se ha detectado trans-complementación en los ensayos de transcripción, ni en ensayos *in vitro* ni *in vivo*. Estos resultados indican además la alta estabilidad de la polimerasa unida a la RNP durante los procesos de transcripción, ya que no se ha observado intercambio de polimerasas.

2.4 NUEVO MODELO DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL

El complejo de la polimerasa residente se activaría transcripcionalmente por el reconocimiento del cap de los mRNAs celulares

y continuaría con el corte y robo de dichas estructuras y la elongación del mRNA del virus (Fig. D6-2). La polimerasa continuaría unida al extremo 5' terminal de la secuencia de promotor durante todo el proceso (Pritlove et al, 1999). Esto daría lugar a una estructura en forma de nudo corredizo que iría disminuyendo de longitud (Fig. D6-2/4) hasta que la polimerasa llega a la señal de poliadenilación de oligo-U (Robertson et al, 1981). Debido al impedimento estérico, la polimerasa rebotaría sobre la secuencia de uridinas y generaría una secuencia 3' terminal de poliA (Fig. D6-5). Para simplificar, el modelo presentado en la Figura D5 muestra la transcripción de la RNP en una forma linealizada, pero el complejo de la polimerasa debe reconocer el 3' terminal del promotor en algún momento más adelante en el proceso, con el fin de reciclar y permitir nuevas rondas de

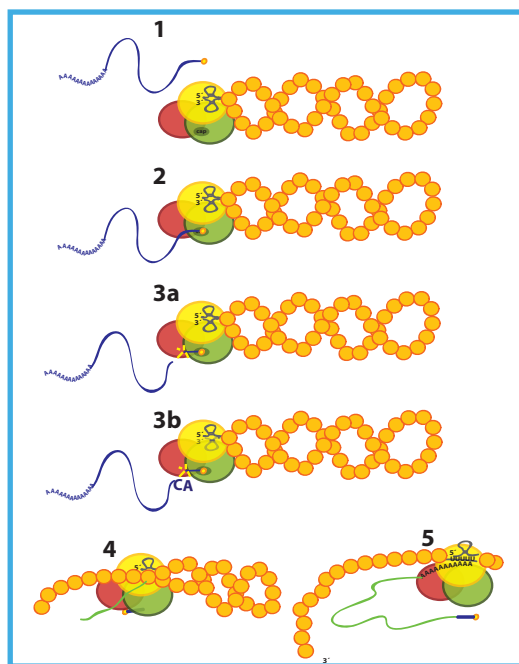


Figura D6. Nuevo modelo de transcripción viral. (1) El *panhandle* preformado estimula tanto la unión a estructuras cap de mRNAs celulares (2) como el corte endonucleotídico (3a). Los mRNAs que contienen en el sitio de corte la secuencia AC únicamente requieren el extremo 5' para la unión a cap y el corte endonucleotídico, mientras que el extremo 3' sirve solo como molde (3b). (4) Elongación del mRNA viral. (5) Poliadenilación y terminación de la transcripción (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

la transcripción. Este modelo de transcripción de RNPs en *cis* es compatible con el hecho de que las RNPs paternas realizan la transcripción primaria como primer paso en la infección, y con el hecho de que se pueden rescatar virus transfectando RNPs purificadas de viriones y/o RNPs recombinantes (Falcón et al, 2004;

Rochovansky & Hirst, 1976). También se ajustan a la correlación de los niveles de mRNA y vRNA de los diversos segmentos de RNA a lo largo del ciclo de la infección (Shapiro et al, 1987; Smith & Hay, 1982).

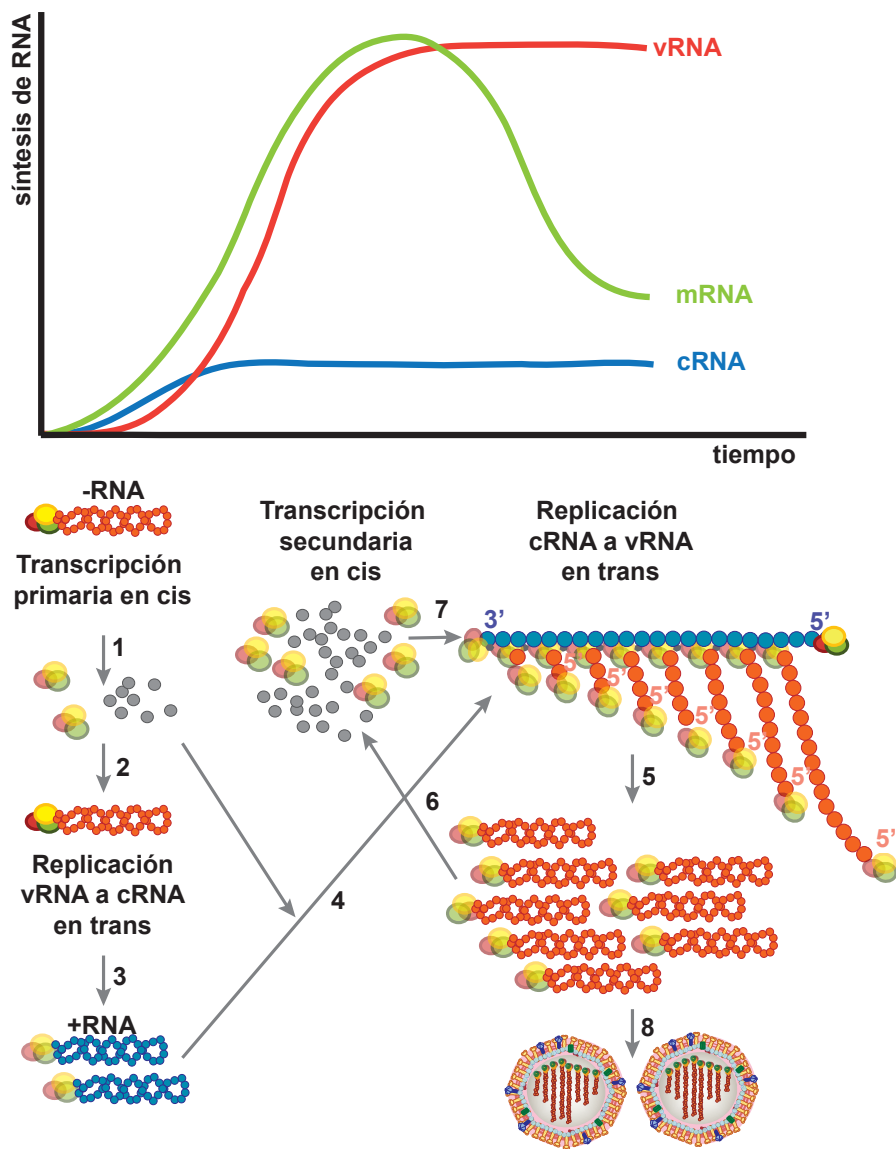
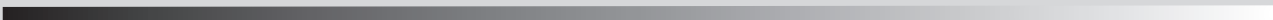
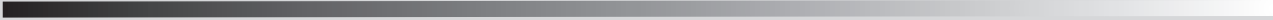


Figura D7. Relación entre la cinética de acumulación de los RNAs virales durante la infección y el modelo de replicación y transcripción. En la parte superior se representa la cinética de acumulación de los RNAs durante la infección, y en la parte inferior se muestran los procesos de transcripción y replicación llevados a cabo por las RNPs. Se representan las cRNPs en azul, las vRNPs en naranja, NP soluble en gris, la polimerasa paterna en colores sólidos y la polimerasa de nueva síntesis en colores semitransparentes (Adaptado de (Jorba 2009, Tesis Doctoral)).

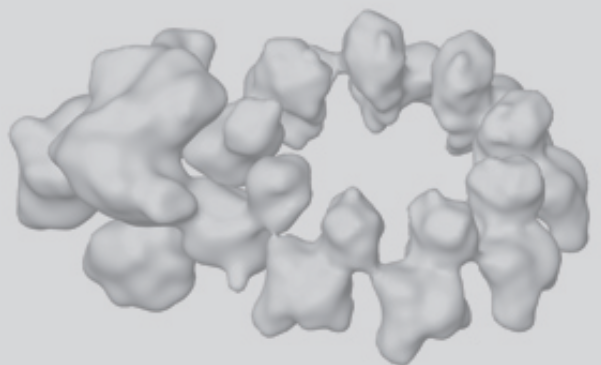
En resumen, no se ha detectado transcripción en *trans in vitro* ni *in vivo* y, por tanto, se propone un modelo de transcripción en *cis* en el que el complejo residente de la polimerasa de la RNP sería el responsable de la síntesis de mRNA y la poliadenilación.

2.5 EL MODELO DE TRANSCRIPCIÓN EN CIS EN EL CONTEXTO DE LA INFECCIÓN VIRAL

En el interior del virión no se ha detectado la presencia de polimerasa soluble, por tanto se asume que sólo se encuentran las 8 RNPs paternas. Una vez el virión entra en la célula, las RNPs se dirigen al núcleo, donde tienen lugar la replicación y la transcripción viral. La transcripción primaria ocurre en primer lugar, las vRNPs sintetizan el mRNA en *cis* (Fig. D7-1). Tras la transcripción primaria se expresan la polimerasa y NP (Fig. D7-2). La polimerasa soluble interacciona con las vRNPs y comienza a replicar en *trans*, la NP y otra polimerasa soluble estabilizan el cRNA de nueva síntesis (Fig. D7-3). Las cRNPs sirven como molde para sucesivas rondas de replicación en las que se generan vRNPs mediante nuevas rondas de replicación en *trans* (Fig. D7-4 y 5). Estas vRNPs servirán como molde para transcripción secundaria (Fig. D7-6 y 7), por lo que se incrementará la concentración de polimerasa y NP libres que a su vez servirán para la generación de vRNPs progenie (Fig. D7-5/8). La síntesis de vRNA es muy superior a la de cRNA ya que a partir de una única molécula de cRNA se generarían múltiples copias de vRNA (Fig. D7).



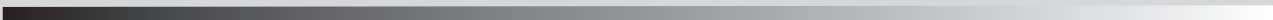
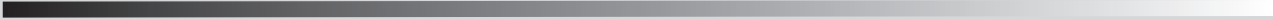
CONCLUSIONES



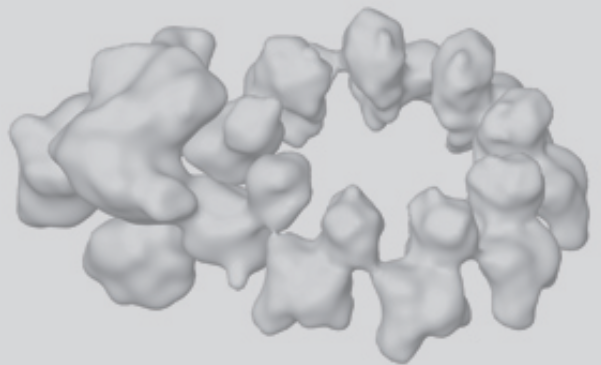
1. La estructura tridimensional de una RNP recombinante de virus de la gripe, obtenida mediante criomicroscopía electrónica está formada por un anillo de 9 nucleoproteínas, resuelto a 12 Å, y el complejo de la polimerasa, resuelto a 18 Å.

2. Los aminoácidos F412 y R416 de la NP están involucrados en la oligomerización y mutaciones en dichos residuos afectan a la replicación viral.

3. La polimerasa residente de la RNP es responsable de la síntesis del mRNA y la poliadenilación en *cis*.



BIBLIOGRAFÍA



1. Albertini AA, Wernimont AK, Muziol T, Ravelli RB, Clapier CR, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**(5785): 360-363
2. Albo C, Valencia A, Portela A (1995) Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus NP polypeptide. *J Virol* **69**: 3799-3806
3. Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP (2000) Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* **74**(18): 8709-8719
4. Amorim MJ, Read EK, Dalton RM, Medcalf L, Digard P (2007) Nuclear Export of Influenza A Virus mRNAs Requires Ongoing RNA Polymerase II Activity. *Traffic* **8**: 1-11
5. Aragón T, de la Luna S, Novoa I, Carrasco L, Ortín J, Nieto A (2000) Translation factor eIF4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translation I activator of influenza virus. *Mol Cell Biol* **20**: 6259-6268
6. Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2004) Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 308-313
7. Asano Y, Ishihama A (1997) Identification of two nucleotide binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem* **122**: 627-634
8. Avalos RT, Yu Z, Nayak DP (1997) Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**(4): 2947-2958
9. Bae SH, Cheong HK, Lee JH, Cheong C, Kainosho M, Choi BS (2001) Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10602-10607
10. Bárcena J, Ochoa M, de la Luna S, Melero JA, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J Virol* **68**(11): 6900-6909
11. Barrett T, Wolstenholme AJ, Mahy BW (1979) Transcription and replication of influenza virus RNA. *Virology* **98**: 211-225
12. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW (1994) Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* **13**(13): 3158-3165
13. Bauer CM, Pinto LH, Cross TA, Lamb RA (1999) The influenza virus M2 ion channel protein: probing the structure of the transmembrane domain in intact cells by using engineered disulfide cross-linking. *Virology* **254**(1): 196-209
14. Beaton AR, Krug RM (1986) Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6282-6286
15. Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP (1998) Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* **72**(7): 5493-5501
16. Biswas SK, Nayak DP (1994) Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**: 1819-1826

17. **Biswas SK, Nayak DP** (1996) Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* **70**(10): 6716-6722
18. **BlaasD, PatzeltE, KeuchlerE** (1982) Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucl Acids Res* **10**: 4803-4812
19. **Bouloy M, Plotch SJ, Krug RM** (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 4886-4890
20. **Braam J, Ulmanen I, Krug RM** (1983) Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* **34**(2): 609-618
21. **Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R, Prins M** (2004) The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* **85**(Pt 4): 983-991
22. **Chacon P, Wriggers W** (2002) Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol* **317**(3): 375-384
23. **Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW** (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**(12): 1306-1312
24. **Chen Z, Li Y, Krug RM** (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *Embo J* **18**(8): 2273-2283
25. **Cheng A, Wong SM, Yuan YA** (2009) Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res* **19**(2): 187-195
26. **Cianci C, Tiley L, Krystal M** (1995) Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. *J Virol* **69**: 3995-3999
27. **Colman PM, Varghese JN, Laver WG** (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**(5912): 41-44
28. **Coloma R, Valpuesta JM, Arranz R, Carrascosa JL, Ortín J, Martín-Benito J** (2009) The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog* **5**(6): e1000491
29. **Compans RW, Chopin PW** (1975) Reproduction of Myxoviruses. In *Comprehensive Virology*, Fraenkel-Conrat H, Wagner RR (eds), Vol. 4, pp 179-252. New York: Plenum Press
30. **Compans RW, Content J, Duesberg PH** (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **4**: 795-800
31. **Czarnota GJ, Andrews DW, Farrow NA, Ottensmeyer FP** (1994) A structure for the signal sequence binding protein SRP54: 3D reconstruction from STEM images of single molecules. *J Struct Biol* **113**(1): 35-46
32. **de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortín J** (1995) Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* **69**: 2427-2433
33. **de la Luna S, Martín J, Portela A, Ortín J** (1993) Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from SV40 recombinant viruses.

- 34.** Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchiev AV, Brownlee GG, Fodor E (2006) The role of Ran Binding Protein 5 (RanBP5) in the nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**(24): 11911-11919
- 35.** Deng T, Sharps J, Fodor E, Brownlee GG (2005) In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* **79**(13): 8669-8674
- 36.** Desselberger U, Raccaniello VR, Zazra JJ, Palese P (1980) The 3' and 5'-end terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**: 315-328
- 37.** Detjen BM, St Angelo C, Katze MG, Krug RM (1987) The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol* **61**(1): 16-22
- 38.** Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW (2009) The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**(7240): 914-918
- 39.** Digard P, Blok VC, Inglis SC (1989) Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* **171**(1): 162-169
- 40.** Digard P, Elton D, Bishop K, Medcalf E, Weeds A, Pope B (1999) Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol* **73**(3): 2222-2231
- 41.** Dunn K, Maxfield FR (1998) Ratio imaging instrumentation. *Methods Cell Biol* **56**: 217-236
- 42.** Elton D, Medcalf E, Bishop K, Digard P (1999a) Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. *Virology* **260**(1): 190-200
- 43.** Elton D, Medcalf L, Bishop K, Harrison D, Digard P (1999b) Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol* **73**(9): 7357-7367
- 44.** Elton D, Simpson HM, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**(1): 408-419
- 45.** Engelhardt O, Sirma H, Pandolfi P, Haller O (2004) Mx1 GTPase accumulates in distinct nuclear domains and inhibits influenza A virus in cells that lack promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *J Gen Virol* **85**(Pt 8): 2315-2326
- 46.** Engelhardt OG, Smith M, Fodor E (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* **79**(9): 5812-5818
- 47.** Falcón AM, Marión RM, Zürcher T, Gómez P, Portela A, Nieto A, Ortín J (2004) Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive (A/Victoria/3/75) influenza viruses expressing deleted forms of NS1 protein. *J Virol* **78**: 3880-3888
- 48.** Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E, Brownlee GG (2003) Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* **278**(22): 20381-20388

49. **Flick R, Hobom G** (1999) Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *J Gen Virol* **80** (Pt 10): 2565-2572
50. **Flick R, Neumann G, Hoffmann E, Neumeier E, Hobom G** (1996) Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna* **2**(10): 1046-1057
51. **Fodor E, Mingay LJ, Crow M, Deng T, Brownlee GG** (2003) A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**(8): 5017-5020
52. **Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG** (1994) The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* **68**(6): 4092-4096
53. **Fodor E, Pritlove DC, Brownlee GG** (1995) Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol* **69**: 4012-4019
54. **Fodor E, Seong BL, Brownlee GG** (1993) Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol* **74**: 1327-1333
55. **Fortes P, Beloso A, Ortín J** (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks RNA nucleocytoplasmic transport. *The EMBO J* **13**: 704-712
56. **Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A** (1996) Spider and web: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* **116**: 190-199
57. **Fuerst TR, Earl PL, Moss B** (1987) Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes. *Mol Cell Biol* **7**: 2538-2544
58. **Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y** (2005) Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* **79**(6): 3766-3774
59. **Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y** (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 2002-2007
60. **Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J** (2005) The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18590-18595
61. **Gabriel G, Herwig A, Klenk HD** (2008) Interaction of Polymerase Subunit PB2 and NP with Importin alpha1 Is a Determinant of Host Range of Influenza A Virus. *PLoS Pathog* **4**(2): e11
62. **Garaigorta U, Falcon AM, Ortín J** (2005) Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. *J Virol* **79**(24): 15246-15257
63. **Garaigorta U, Ortín J** (2007) Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA. *Nucleic Acids Res en revisión*
64. **Garcia-Robles I, Akarsu H, Muller CW, Ruigrok RW, Baudin F** (2005) Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* **332**(1): 329-336

- 65.** Garfinkel MS, Katze MG (1992) Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells. *J Biol Chem* **267**: 9383-9390
- 66.** Garfinkel MS, Katze MG (1993) Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **268**(30): 22223-22226
- 67.** Gastaminza P, Perales B, Falcón AM, Ortín J (2003) Influenza virus mutants in the N-terminal region of PB2 protein are affected in virus RNA replication but not transcription. *J Virol* **76**: 5098-5108
- 68.** Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Benink JR, Yewdell JW (2003) The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol* **77**(13): 7214-7224
- 69.** Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2001a) Recombination in the hemagglutinin gene of the 1918 "Spanish flu". *Science* **293**(5536): 1842-1845
- 70.** Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2001b) The haemagglutinin gene, but not the neuraminidase gene, of 'Spanish flu' was a recombinant. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1416): 1845-1855
- 71.** Gluzman Y (1981) SV40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182
- 72.** Gómez-Puertas P, Albo C, Pérez-Pastrana E, Vivo A, Portela A (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**(24): 11538-11547
- 73.** Gomez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Perez-Pastrana E, Portela A (1999) Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol* **80**: 1635-1645
- 74.** González S, Ortín J (1999a) Characterization of the influenza virus PB1 protein binding to vRNA: Two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. *J Virol* **73**: 631-637
- 75.** González S, Ortín J (1999b) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J* **18**: 3767-3775
- 76.** González S, Zürcher T, Ortín J (1996) Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein responsible for interaction with the PB2 and PA subunits: A model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res* **24**: 4456-4463
- 77.** Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74
- 78.** Green TJ, Zhang X, Wertz GW, Luo M (2006) Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* **313**(5785): 357-360
- 79.** Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortín J, Hart DJ, Cusack S (2008) The structural basis for cap-binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 500-506
- 80.** Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S (2007) NS1 Protein of Influenza A Virus

Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(3): 263-269

81. Guu TS, Dong L, Wittung-Stafshede P, Tao YJ (2008) Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. *Virology* 379(1): 135-142

82. Hagen M, Chung TD, Butcher JA, Krystal M (1994) Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J Virol* 68(3): 1509-1515

83. Hagen M, Tiley L, Chung TD, Krystal M (1995) The role of template-primer interactions in cleavage and initiation by the influenza virus polymerase. *J Gen Virol* 76 (Pt 3): 603-611

84. Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG (2006) Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* 80(16): 7789-7798

85. Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hamada N, Mizoue K, Tsumura N, Kato H, Toyoda T (2001) Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes to Cells* 6: 87-97

86. Hatada E, Fukuda R (1992) Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol* 73: 3325-3329

87. Hatada E, Saito S, Fukuda R (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol* 73(2425): 2425-2433

88. Hatada E, Saito S, Okishio N, Fukuda R (1997) Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. *J Gen Virol* 78: 1059-1063

89. Hatada E, Takizawa T, Fukuda R (1992) Specific binding of influenza virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro. *J Gen Virol* 73: 17-25

90. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293(5536): 1840-1842

91. Hay AJ, Lomniczi B, Bellamy AR, Skehel JJ (1977) Transcription of the influenza virus genome. *Virology* 83: 337-355

92. Hay AJ, Skehel JJ, McCauley J (1982) Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. *Virology* 116: 517-522

93. He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z, Liu Y (2008) Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 454(7208): 1123-1126

94. Heggeness MH, Smith PR, Ulmanen I, Krug RM, Chopin PW (1982) Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus. *Virology* 118: 466-470

95. Helenius A (1992) Unpacking the incoming influenza virus. *Cell* 69: 577-578

96. Hemerka JN, Wang D, Weng Y, Lu W, Kaushik RS, Jin J, Harmon AF, Li F (2009) Detection and Characterization of Influenza A Virus Pa-Pb2 Interaction through a Bimolecular Fluorescence Complementation Assay. *J Virol* 83 (8):

- 97. Heymann JB** (2001) Bsoft: image and molecular processing in electron microscopy. *J Struct Biol* **133**(2-3): 156-169
- 98. Hirayama E, Atagi H, Hiraki A, Kim J** (2004) Heat shock protein 70 is related to thermal inhibition of nuclear export of the influenza virus ribonucleoprotein complex. *J Virol* **78**(3): 1263-1270
- 99. Hobson SD, Rosenblum ES, Richards OC, Richmond K, Kirkegaard K, Schultz SC** (2001) Oligomeric structures of poliovirus polymerase are important for function. *Embo J* **20**(5): 1153-1163
- 100. Holsinger LJ, Lamb RA** (1991) Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology* **183**(1): 32-43
- 101. Honda A, Mizumoto K, Ishihama A** (1999) Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* **4**(8): 475-485
- 102. Honda A, Mukaigawa J, Yokoiyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, Krystal M, Nayak DP, Ishihama A** (1990) Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem Tokyo* **107**(4): 624-628
- 103. Honda A, Okamoto T, Ishihama A** (2007) Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* **12**(2): 133-142
- 104. Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A** (1987) Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *J Biochem Tokyo* **102**(5): 1241-1249
- 105. Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A** (1988) RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* **104**(6): 1021-1026
- 106. Horne RW, Waterson AP, Wildy P, Farnham AE** (1960) The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies on the structure of myxoviruses particles by negative staining techniques. *Virology* **11**: 79-88
- 107. Hoyle L, Horne RW, Waterson AP** (1961) The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether. *Virology* **13**: 448-459
- 108. Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P** (1987) Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 8140-8144
- 109. Huang TS, Palese P, Krystal M** (1990) Determination of influenza virus proteins required for genome replication. *J Virol* **64**(11): 5669-5673
- 110. Huarte M, Falcon A, Nakaya Y, Ortin J, Garcia-Sastre A, Nieto A** (2003) Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol* **77**(10): 6007-6013
- 111. Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J, Nieto A** (2001) PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* **75**: 8597-8604
- 112. Hughey PG, Roberts PC, Holsinger LJ, Zebedee SL, Lamb RA, Compans RW** (1995) Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus as-

113. Inglis SC, Barret T, Brown CM, Almond JW (1979) The smallest genome RNA segment of influenza virus contains two genes that may overlap. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3790-3794

114. Inglis SC, Brown CM (1981) Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. *Nucleic Acid Res* **9**: 2727-2740

115. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y (2006) The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* **80**(11): 5233-5240

116. Jorba N (2009) Tesis Doctoral.

117. Jorba N, Area E, Ortín J (2008a) Oligomerisation of the influenza virus polymerase complex in vivo. *J Gen Virol* **89**: 520-524

118. Jorba N, Coloma R, Ortín J (2009) Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog* **5**(5): e1000462

119. Jorba N, Juarez S, Torreira E, Gastaminza P, Zamarreño N, Albar JP, Ortín J (2008b) Analysis of the interaction of influenza virus polymerase complex with human cell factors. *Proteomics* **8**: 2077-2088

120. Kato A, Mizumoto K, Ishihama A (1985) Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus. *Virus Res* **3**(2): 115-127

121. Katze MG, Krug RM (1990) Translational control in influenza virus-infected cells. *Enzyme* **44**(265): 265-277

122. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG (1989) Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**(11): 4603-4608

123. Kerry P, Willsher N, Fodor E (2008) A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology* **30**(373): 202-210

124. Kim HJ, Fodor E, Brownlee GG, Seong BL (1997) Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo. *J Gen Virol* **78** (Pt 2): 353-357

125. Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F (1997) Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *Embo J* **16**(6): 1248-1257

126. Kobayashi M, Toyoda T, Ishihama A (1996) Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. *Arch Virol* **141**: 525-539

127. Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L (2007) Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* **81**(13): 7011-7021

128. Kohonen T (1990) Cortical maps. *Nature* **346**(6279): 24

129. Kolpashchikov DM, Honda A, Ishihama A (2004) Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry* **43**(19): 5882-5887

130. Krug RA, Ueda M, Palese P (1975) Temperature-sensitive mutants of influenza WSN

virus defective in virus-specific RNA synthesis. *J Virol* **16**: 790-796

131. Krug RM, Alonso-Kaplen FV, Julkunen I, Katze MG (1989) Expression and replication of the influenza virus genome. In *The influenza viruses*, Krug RM (ed), pp 89-152. New York: Plenum Press

132. Krug RM, Broni BA, Bouloy M (1979) Are the 5'-ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell* **18**: 329-334

133. Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S, Naffakh N (2007) Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* **362**(2): 271-282

134. Lamb RA, Choppin PW (1976) Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. *Virology* **74**(504): 504-519

135. Lamb RA, Choppin PW (1979) Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4908-4912

136. Lamb RA, Choppin PW (1983) The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* **52**(467): 467-506

137. Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ (1980) Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(1857): 1857-1861

138. Lamb RA, Lai CJ (1980) Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned

DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. *Cell* **21**: 475-485

139. Lamb RA, Lai CJ, Choppin PW (1981) Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4170-4174

140. Leahy M, Dobbyn H, Brownlee G (2001) Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J Virol* **75**(15): 7042-7049

141. Lee MT, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L (2002) Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **30**(2): 429-438

142. Lee MT, Klumpp K, Digard P, Tiley L (2003) Activation of influenza virus RNA polymerase by the 5' and 3' terminal duplex of genomic RNA. *Nucleic Acids Res* **31**(6): 1624-1632

143. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**(6996): 209-213

144. Li ML, Ramirez BC, Krug RM (1998) RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *Embo J* **17**(19): 5844-5852

145. Li ML, Rao P, Krug RM (2001) The active sites of the influenza cap-dependent endo-

nuclease are on different polymerase subunits. *EMBO Journal* **20**: 2078-2086

146. Liang Y, Hong Y, Parslow TG (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol* **79**(16): 10348-10355

147. Liang Y, Huang T, Ly H, Parslow TG (2008) Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments. *J Virol* **82**(1): 229-236

148. Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM (1995) Influenza type A virus neuramidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* **69**(2): 1099-1106

149. López-Turiso JA, Martínez C, Tanaka T, Ortín J (1990) The synthesis of influenza virus negative-strand RNA takes place in insoluble complexes present in the nuclear matrix fraction. *Virus Res* **16**(3): 325-337

150. Luo GX, Luytjes W, Enami M, Palese P (1991) The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**(6): 2861-2867

151. Luo M, Green TJ, Zhang X, Tsao J, Qiu S (2007) Structural comparisons of the nucleoprotein from three negative strand RNA virus families. *Virol J* **4**: 72

152. Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, Kirkegaard K (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **296**(5576): 2218-2222

153. Ma K, Roy A, Whittaker G (2001) Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at

the nuclear periphery. *Virology* **282**(2): 215-220

154. Mahy BWJ (1983) Mutants of influenza virus. In *Genetics of influenza viruses*, Palese P, Kingsbury DW (eds), pp 192-253. Wien: Springer Verlag

155. Maier H, Kashiwagi T, Hara K, Brownlee G (2008) Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology* **5**(370): 194-204

156. Mandler J, Muller K, Scholtissek C (1991) Mutants and revertants of an avian influenza A virus with temperature-sensitive defects in the nucleoprotein and PB2. *Virology* **181**(2): 512-519

157. Marabini R, Masegosa IM, San Martín C, Marco S, Fernández JJ, de la Fraga LG, Vaquerizo C, Carazo JM (1996) X-mipp: an image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **116**: 237-240

158. Marco S, Chagoyen M, de la Fraga LG, Carazo JM, Carrascosa JL (1996) A variant of the "random approximation" of the reference-free alignment algorithm. *Ultramicroscopy* **66**: 5-10

159. Marión RM, Aragón T, Beloso A, Nieto A, Ortín J (1997) The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation. *Nucleic Acids Res* **25**: 4271-4277

160. Martin K, Helenius A (1991a) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**(1): 117-130

161. Martin K, Helenius A (1991b) Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* **65**(1): 232-244

- 162.** Martín-Benito J, Area E, Ortega J, Llorca O, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2001) Three dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports* **2**: 313-317
- 163.** Mayer D, Molawi K, Martinez-Sobrido L, Ghanem A, Thomas S, Baginsky S, Grossmann J, Garcia-Sastre A, Schwemmle M (2007) Identification of Cellular Interaction Partners of the Influenza Virus Ribonucleoprotein Complex and Polymerase Complex Using Proteomic-Based Approaches. *J Proteome Res* **6**(2): 672-682
- 164.** Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S (2008) The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol* **10**(5): 1140-1152
- 165.** McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA (2007) Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* **2**(4): 240-249
- 166.** McCown MF, Pekosz A (2006) Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J Virol* **80**(16): 8178-8189
- 167.** Medcalf L, Poole E, Elton D, Digard P (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol* **73**(9): 7349-7356
- 168.** Mehle A, Doudna JA (2008) An inhibitory activity in human cells restricts the function of an avian-like influenza virus polymerase. *Cell Host Microbe* **4**(2): 111-122
- 169.** Mena I, de la Luna S, Albo C, Martín J, Nieto A, Ortín J, Portela A (1994) Synthesis of biologically active influenza virus core proteins using a vaccinia-T7 RNA polymerase expression system. *J Gen Virol* **75**: 2109-2114
- 170.** Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A (2007) Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* **81**(2): 514-524
- 171.** Min JY, Krug RM (2006) The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7100-7105
- 172.** Mindell JA, Grigorieff N (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol* **142**(3): 334-347
- 173.** Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P, Nagata K (2001) Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**(4): 1899-1908
- 174.** Momose F, Kikuchi Y, Komase K, Morikawa Y (2007) Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect* **9**(12-13): 1422-1433
- 175.** Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K (2002) Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* **277**(47): 45306-45314
- 176.** Mukaigawa J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J*

177. Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* **80**(5): 2318-2325

178. Murti KG, Bean WJ, Jr., Hsu CH (1980) A rapid method for visualization of single-stranded genomic RNAs of animal viruses. *J Ultrastruct Res* **70**(1): 52-57

179. Nath ST, Nayak DP (1990) Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1N1). *Mol Cell Biol* **10**(8): 4139-4145

180. Nayak DP, Hui EK, Barman S (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**(2): 147-165

181. Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* **71**(12): 9690-9700

182. Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *Embo J* **19**(24): 6751-6758

183. Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9345-9350

184. Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS (2008) Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol*

185. Nieto A, de la Luna S, Bárcena J, Portela A, Ortín J (1994) Complex structure of the nuclear translocation signal of the influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol* **75**: 29-36

186. Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**(7075): 490-492

187. Noton S, Medcalf E, Fisher D, Mullin A, Elton D, Digard P (2007) Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol* **88**(Pt 8): 2280-2290.

188. Noton SL, Simpson-Holley M, Medcalf E, Wise HM, Hutchinson EC, McCauley JW, Digard P (2009) Studies of an influenza A virus temperature-sensitive mutant identify a late role for NP in the formation of infectious virions. *J Virol* **83**(2): 562-571

189. O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**(39): 22701-22704

190. O'Neill RE, Talon J, Palese P (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Embo J* **17**(1): 288-296

191. Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JR, Park SY (2008) The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* **454**(7208): 1127-1131

192. Ochoa M, Bárcena J, de la Luna S, Melero JA, Douglas AR, Nieto A, Ortín J, Skehel

JJ, Portela A (1995) Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides. *Virus Res* **37**: 305-315

193. Ohtsu Y, Honda Y, Sakata Y, Kato H, Toyoda T (2002) Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* **46**(3): 167-175

194. Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J (2000) Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**: 156-163

195. Ortín J, Nájera R, López C, Dávila M, Domingo E (1980) Genetic variability of Hong Kong (H3N2) influenza viruses: spontaneous mutations and their location in the viral genome. *Gene* **11**: 319-331

196. Ozawa M, Maeda J, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y (2009) Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol* **83**(7): 3384-3388.

197. Palese P, Shaw M (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology 5th edition*, Knipe DM, Howley PM (eds), Vol. 1, pp 1647-1689. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

198. Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans R (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**(2): 397-410

199. Park YW, Katze MG (1995) Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA trans-

lation. *J Biol Chem* **270**(47): 28433-28439

200. Pascual A, Bárcena M, Merelo J, Carazo J (2000) Mapping and fuzzy classification of macromolecular images using self-organizing neural networks. *Ultramicroscopy* **84**(1-2): 85-99

201. Pascual-Montano A, Donate LE, Valle M, Barcena M, Pascual-Marqui RD, Carazo JM (2001) A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images. *J Struct Biol* **133**(2-3): 233-245

202. Pascual-Montano A, Taylor KA, Winkler H, Pascual-Marqui RD, Carazo JM (2002) Quantitative self-organizing maps for clustering electron tomograms. *J Struct Biol* **138**(1-2): 114-122

203. Perales B, de la Luna S, Palacios I, Ortín J (1996) Mutational analysis identifies functional domains in the Influenza A PB2 polymerase subunit. *J Virol* **70**: 1678-1686

204. Perales B, Ortín J (1997) The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J Virol* **71**: 1381-1385

205. Perales B, Sanz-Ezquerro JJ, Gastaminza P, Ortega J, Fernández-Santarén J, Ortín J, Nieto A (2000) The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol* **74**: 1307-1312

206. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**(13): 1605-1612

207. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-

stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**(5801): 997-1001

208. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528

209. Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* **23**: 847-858

210. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N (1990) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* **8**: 3867-3874

211. Pons MW (1971) Isolation of Influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA in viral RNP. *Virology* **46**: 149-160

212. Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P (2004) Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* **321**(1): 120-133

213. Poon LL, Pritlove DC, Sharps J, Brownlee GG (1998) The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol* **72**: 8214-8219

214. Poon LLM, Pritlove DC, Fodor E, Brownlee GG (1999) Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *J Virol* **73**(3473-3476): 3473-3476

215. Portela A, Digard P (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**(Pt 4): 723-734

216. Portela A, Zürcher T, Nieto A, Ortín J (1999) Replication of Orthomyxoviruses. *Adv Virus Res* **54**: 319-348

217. Pritlove DC, Poon LLM, Devenish LJ, Mike B, Leahy MB, Brownlee GG (1999) A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro. *J Virol* **73**: 2109-2114

218. Qin W, Luo H, Nomura T, Hayashi N, Yamashita T, Murakami S (2002) Oligomeric interaction of hepatitis C virus NS5B is critical for catalytic activity of RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**(3): 2132-2137

219. Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM (1995) The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. *Rna* **1**(3): 304-316

220. Rameix-Welti M, Tomoiu A, Afonso EDS, Werf Svd, Naffakh N (2009) Avian Influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection. *J Virol* **83**(3): 1320-1331

221. Rao P, Yuan W, Krug RM (2003) Crucial role of CA cleavage sites in the cap-snatching mechanism for initiating viral mRNA synthesis. *Embo J* **22**(5): 1188-1198

222. Resa-Infante P, Jorba N, Zamarreño N, Fernández Y, Juárez S, Ortín J (2008) The host-dependent interaction of a-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. *PLoS ONE* **3** (12)

223. Roberts PC, Lamb RA, Compans RW (1998) The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* **240**(1): 127-137

- 224.** Robertson JS (1979) 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acid Research* **6**(12): 3745-3757
- 225.** Robertson JS, Schubert M, Lazzarini RA (1981) Polyadenylation sites for influenza mRNA. *J Virol* **38**: 157-163
- 226.** Rochovansky OM, Hirst GK (1976) Infectivity and marker rescue activity of influenza virus ribonucleoprotein-polymerase complexes. *Virology* **73**: 339-349
- 227.** Rose JK, Buonocore L, Whitt MA (1991) A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques* **10**: 520-525
- 228.** Rott R, Scholtissek C (1970) Specific inhibition of influenza replication by alpha-amanitin. *Nature* **228**(5266): 56
- 229.** Rudolph MG, Kraus I, Dickmanns A, Eickmann M, Garten W, Ficner R (2003) Crystal structure of the Borna Disease Virus nucleoprotein. *Structure* **11**(10): 1219-1226
- 230.** Ruigrok RW, Baudin F (1995) Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol* **76**: 1009-1014
- 231.** Sambrook J, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, Second Edition edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 232.** Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1995) Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of co-expressed proteins. *J Virol* **69**: 2420-2426
- 233.** Sanz-Ezquerro JJ, Fernández Santarén J, Sierra T, Aragón T, Ortega J, Ortín J, Smith GL, Nieto A (1998) The PA influenza polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* **79**: 471-478
- 234.** Sanz-Ezquerro JJ, Zürcher T, de la Luna S, Ortín J, Nieto A (1996) The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol* **70**: 1905-1911
- 235.** Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**(4): 2038-2044
- 236.** Scholtissek C, Rott R (1970) Synthesis in vivo of influenza virus plus and minus strand RNA and its preferential inhibition by antibiotics. *Virology* **40**(4): 989-996
- 237.** Schroeder C, Heider H, Moncke-Buchner E, Lin TI (2005) The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**(1): 52-66
- 238.** Sha B, Luo M (1997) Structure of a bi-functional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* **4**(3): 239-244
- 239.** Shapiro GI, Gurney TJ, Krug RM (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* **61**(3): 764-773
- 240.** Shapiro GI, Krug RM (1988) Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* **62**(7): 2285-2290

- 241.** Shi L, Galarza JM, Summers DF (1996) Recombinant-baculovirus-expressed PB2 subunit of the influenza A virus RNA polymerase binds cap groups as an isolated subunit. *Virus Res* **42**: 1-9
- 242.** Shih SR, Nemeroff ME, Krug RM (1995) The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6324-6328
- 243.** Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, McCauley J, Digard P (2002) A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza viruses. *Virology* **301**(2): 212-225
- 244.** Skehel J, Bizebard T, Bullough P, Hughson F, Knossow M, Steinhauer D, Wharton S, Wiley D (1995) Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 573-580
- 245.** Smith GL, Hay AJ (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology* **118**: 96-108
- 246.** Sorzano CO, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SH, Carazo JM, Pascual-Montano A (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **148**(2): 194-204
- 247.** Stark H, Rodnina MV, Wieden HJ, Zemlin F, Wintermeyer W, van Heel M (2002) Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nat Struct Biol* **9**(11): 849-854
- 248.** Stegmann T, Booy FP, Wilschut J (1987a) Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem* **262**(36): 17744-17749
- 249.** Stegmann T, Morselt HW, Scholma J, Wilschut J (1987b) Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta* **904**(1): 165-170
- 250.** Tabor S (1987) Exonucleases. In *Current protocols in molecular biology*, Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (eds). New York: Greene Publishing Associates-Wiley
- 251.** Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP, Hart DJ (2007) Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 229-233
- 252.** Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S, Hart DJ (2008) Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136
- 253.** Testa SM, Disney MD, Turner DH, Kierzek R (1999) Thermodynamics of RNA-RNA duplexes with 2- or 4-thiouridines: implications for antisense design and targeting a group I intron. *Biochemistry* **38**(50): 16655-16662
- 254.** Thuman-Commike PA (2001) Single particle macromolecular structure determination via electron microscopy. *FEBS Lett* **505**(2): 199-205
- 255.** Tiley LS, Hagen M, Mathews JT, Krystal M (1994) Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5'-end of the viral RNAs. *J Virol*

- 256.** Torreira E, Schoehn G, Fernández Y, Jorba N, Ruigrok RW, Cusack S, Ortin J, Llorca O (2007) Three-dimensional model for the isolated influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* **35**: 3774-3783
- 257.** Ulmanen I, Broni BA, Krug RM (1981) The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7355-7359
- 258.** Ulmanen I, Broni BA, Krug RM (1983) Influenza virus temperature-sensitive cap (m7GpppNm)-dependent endonuclease. *J Virol* **45**(1): 27-35
- 259.** Valle M, Zavialov A, Sengupta J, Rawat U, Ehrenberg M, Frank J (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**(1): 123-134
- 260.** Varghese JN, Laver WG, Colman PM (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**(5912): 35-40
- 261.** Vreede FT, Brownlee GG (2007) Influenza virion-derived viral ribonucleoproteins synthesize both mRNA and cRNA in vitro. *J Virol* **81**(5): 2196-2204
- 262.** Vreede FT, Jung TE, Brownlee GG (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* **78**(17): 9568-9572
- 263.** Wang P, Palese P, O'Neill RE (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a non-conventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**(3): 1850-1856
- 264.** Wang QM, Hockman MA, Staschke K, Johnson RB, Case KA, Lu J, Parsons S, Zhang F, Rathnachalam R, Kirkegaard K, Colacino JM (2002) Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **76**(8): 3865-3872
- 265.** Wang W, Cui ZQ, Han H, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Chen Z, Zhang XE (2008) Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Res* **36**(15): 4913-4928
- 266.** Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y (2003) Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* **77**(19): 10575-10583
- 267.** Weber F, Kochs G, Gruber S, Haller O (1998) A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. *Virology* **250**(1): 9-18
- 268.** Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**(6172): 426-431
- 269.** WHO (1980) A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* **58**(4): 585-591
- 270.** Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R, Urlaub G, Chasin L (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3): 1373-1376
- 271.** Wu WW, Weaver LL, Pante N (2007) Ultrastructural analysis of the nuclear localization

tion sequences on influenza A ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* **374**(4): 910-916

272. Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y (2006) Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* **444**(7117): 378-382

273. Yamanaka K, Ishihama A, Nagata K (1990) Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* **265**(19): 11151-11155

274. Yasuda J, Nakada S, Kato A, Toyoda T, Ishihama A (1993) Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**(1): 249-255

275. Ye Q, Krug RM, Tao YJ (2006) The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**(7122): 1078-1082

276. Ye Z, Baylor NW, Wagner RR (1989) Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. *J Virol* **63**: 3586-3594

277. Ye Z, Pal R, Fox JW, Wagner RR (1987) Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *J Virol* **61**: 239-246

278. Young RJ, Content J (1971) 5' -terminus of influenza virus RNA. *Nature New Biol* **230**: 140-142

279. Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y (2009) Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**(7240): 909-913

280. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P (2006) Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**(16): 7976-7983

281. Zebedee SL, Lamb RA (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **62**(8): 2762-2772

282. Zheng H, Palese P, Garcia Sastre A (1996) Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology* **217**(1): 242-251

